

*A mamma e papà*

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**

**FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN NEUROBIOLOGIA**

**Tesi di Laurea:**

**“Effetti del PACAP-38 in forme di plasticità  
sinaptica nella sanguisuga *Hirudo medicinalis*”**

*Relatori:*

**Chiar.mo Prof. MARCELLO BRUNELLI**

**Dr.ssa ROSSANA SCURI**

*Candidata:*

**LAURA LOMBARDI**

**Anno Accademico 2007-2008**

## ABBREVIAZIONI

**5HT:** 5-idrossitriptamina, serotonina

**AC:** adenilato ciclastasi

**AA:** acido arachidonico

**AHP:** *afterhyperpolarization*, iperpolarizzazione postuma

**APV:** 2-amino-5-fosfonovalerato

**ATP:** adenosin trifosfato

**cAMP:** adenosin-3',5'-monofosfato ciclico

**cGMP:** guanosin-3',5'-monofosfato ciclico

**DMSO:** dimetilsolfossido

**ERK:** *extracellular signal-regulated kinases*

**E.S.:** errore standard

**EPSP:** potenziale postsinaptico eccitatorio

**F:** indice di Fischer

**fEPSPs:** potenziali postsinaptici eccitatori di campo

**gK/Ca:** conduttanza  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ -dipendente

**IP<sub>3</sub>:** inositolo trifosfato

**IPSP:** potenziale postsinaptico inibitorio

**L<sub>10</sub>:** latenza misurata dopo 10 min dal trattamento

**Lm:** latenza media

**LTP:** *long term potentiation*

**LY83583:** 6-Anilino-5,8-quinolinechinone

**MAPK:** *mitogen activated protein-kinase*

**MDL 12330 A:** *cis*- N- (2- fenilciclopentil)- azaciclotridec- 1- en- 2- amin  
idrocloride

**N:** nocicettiva

**NMDA:** acido N-metil-D-aspartato

**OLP:** cellule progenitrici degli oligodendrociti

**p:** probabilità

**P:** pressoria

**PACAP-27:** *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (peptide di 27  
amminoacidi)

**PACAP-38:** *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (peptide di 38  
amminoacidi)

**PAC<sub>1</sub>-R:** recettore del PACAP di tipo I

**PAR:** *passive avoidance response*

**PLC:** fosfolipasi C

**PKA:** protein chinasi A

**PKC:** protein chinasi C

**R<sub>m</sub>:** resistenza di membrana

**SIU:** *Stimulus Isolation Unit*

**T:** tattile

**V<sub>m</sub>:** potenziale di membrana

**VPAC<sub>1</sub>-R:** recettore del PACAP di tipo II (sottotipo 1)

**VPAC<sub>2</sub>-R:** recettore del PACAP di tipo II (sottotipo 2)

## Abstract

PACAP-38 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) is a 38 amino acids peptide isolated from ovine hypothalamus. It is widely distributed in the central nervous system (Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000) and it modulates various physiological functions. Its sequence is well preserved in several species suggesting that PACAP-38 plays a role in different physiological functions.

PACAP-38 is known to be involved in learning processes (Arimura, 1992; Masuo et al., 1993) in both Vertebrates and Invertebrates. At very low dosages PACAP-38 enhances learning in rats, immediately after the acquisition of a passive avoidance response paradigm (Sacchetti et al., 2001). In the hippocampus, structure involved in learning and memory, the application of PACAP-38 (0.05 nM) induces a long-lasting facilitation of the basal transmission (Roberto & Brunelli, 2000; Roberto et al., 2001).

In some Invertebrates a neuropeptide homologous to mammalian PACAP has been found and its absence produces learning deficits (Kandel & Abel, 1995).

In *Drosophila*, the *amnesiac* gene produces a polypeptide closely related to human PACAP-38, which plays an important role in memory consolidation (Feany & Quinn, 1995; Davis, 1996).

In order to investigate the mechanisms by which PACAP-38 acts, we have analyzed the effects of PACAP-38 in the onset of swim induction in the leech *H. medicinalis*. This animal model allows to correlate behavioral changes with modifications occurring in the neural networks at cellular level.

The study has been performed at both behavioral and cellular level.

First we analyzed the effect of PACAP-38 in swim induction paradigm.

In leeches with the connection between the cephalic and the first segmental ganglion disconnected, a weak electrical stimulus (test stimulus) consisting of a 1.6 s train of 5 ms current impulses at a frequency of 8.3 Hz induces a swim cycle. The interval between the start of the test stimulus and the onset of the swimming wave (i.e. latency) was selected as a reliable response index. The onset of swimming was

directly signalled by the operator through an “off” button connected to the computer and latencies were measured by means of custom-designed software.

We have detected the latency before and after the injections of different concentrations of PACAP-38 (0.01–1 nM) and we have found that 0.1 nM PACAP-38 induces sensitisation.

In the swim induction paradigm, the electrical stimulation selectively activates T sensory neurons. The decrease of the latency measured after PACAP-38 treatment indicates that the peptide induces a reduction of the responsiveness of the animals to the test stimulus suggesting that PACAP-38 might produce changes of the electrophysiological parameters in T neurons.

We have performed intracellular recordings in T sensory neurons of segmental ganglia dissected out from *naïve* leeches and perfused with  $5 \cdot 10^{-3}$  nM PACAP-38 for 5 min. Measurements of different parameters have been made as follows. Rm has been evaluated by injecting a hyperpolarizing current impulse (0.2–0.5 nA, 200 ms) and measuring the resulting change in membrane potential; AHP has been induced by injecting 3 s trains of intracellular depolarizing impulses (200 ms, 2.5 Hz). Vm measurements have been also made.  $5 \cdot 10^{-3}$  nM PACAP-38 perfusion reduced significantly the AHP amplitude without affecting both Rm and Vm at 20 min washing. This effect was still present also in the presence of 1 nM apamine, a blocker of the  $K^+/Ca^{2+}$ -operated channels which partially determines the AHP. This suggests that PACAP-38 affects the  $Na^+/K^+$ -ATPase activity which is the main determinant of the AHP in T cells.

PACAP-38 induced its effects 20 min after its application suggesting that a cascade of intracellular signals was activated. To better understand the intracellular pathway PACAP-activated we have performed intracellular recordings from T neurons in the presence of either LY83583 0,1  $\mu$ M or MDL 12330A 1  $\mu$ M, a guanylate- and an adenylate-cyclase blocker respectively. In the former case PACAP-38 exerted its effects on AHP whereas in the latter case the co-application with MDL 12330A 1  $\mu$ M not only did not provoke a reduction of the AHP amplitude but induced an increase in the AHP amplitude suggesting the involvement of the cAMP pathway.

Our results show that PACAP-38 modulates, through cAMP pathway, the integration of sensory stimuli operated by T neurons so inducing a sensitizing effect during swim induction by weak electrical stimuli.

## Riassunto

PACAP-38 è un peptide di 38 amminoacidi la cui sequenza è ben conservata in molte specie animali. Agisce da neuromodulatore e da neurotrasmettitore nel sistema nervoso centrale e periferico (Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000) ed inoltre è presente in diversi tessuti periferici. Ciò suggerisce un suo ruolo regolatorio in molte funzioni fisiologiche. Alcuni studi hanno evidenziato un suo ruolo nel migliorare l'apprendimento e la memoria sia nei Vertebrati che negli Invertebrati (Arimura, 1992; Masuo et al., 1993). Ad esempio, nei ratti è stato dimostrato che PACAP-38, a bassi dosaggi, migliora significativamente l'acquisizione del paradigma di *passive avoidance response* (Sacchetti et al., 2001). A livello dell'ippocampo, struttura coinvolta nei fenomeni di apprendimento e memoria, è stato evidenziato un aumento dei fEPSPs nella regione CA1 durante la trasmissione sinaptica basale (Roberto & Brunelli, 2000; Roberto et al., 2001).

In alcuni Invertebrati la mancanza di un peptide omologo al PACAP dei Mammiferi, determina *deficit* nell'apprendimento (Kandel & Abel, 1995). In *Drosophila*, per esempio, i mutanti per il gene che codifica per il neuropeptide PACAP-simile *amnesiac* (Feany & Quinn, 1995), hanno disturbi nel consolidamento mnemonico (Davis, 1996).

Allo scopo di indagare i meccanismi d'azione di PACAP-38 sono stati analizzati gli effetti del neuropeptide nell'induzione al nuoto nella sanguisuga *H. medicinalis*, dove è possibile correlare cambiamenti del comportamento con modificazioni dell'attività cellulare e dei circuiti neurali.

L'analisi è stata condotta sia a livello comportamentale sia a livello cellulare.

In animali aventi il ganglio cefalico disconnesso dal primo segmentale sono stati indotti cicli di nuoto applicando sulla cute in posizione caudale lievi stimoli elettrici (stimolo test) costituiti da treni della durata di 1,6 s di impulsi quadri (5 ms, 8,3 Hz). Mediante un opportuno *software* collegato ad un dispositivo ON/OFF è stato misurato l'intervallo di tempo che intercorre tra l'applicazione dello stimolo test e



l'inizio del nuoto (latenza), prima e dopo iniezione di una soluzione contenente PACAP-38 a varie concentrazioni (0,01 nM - 1 nM).

La valutazione delle variazioni di latenza indotte dall'iniezione di PACAP-38 ha dimostrato che alla concentrazione di 0,1 nM il neuropeptide produce effetto sensitizzante.

Lo stimolo test da noi utilizzato nel paradigma dell'induzione al nuoto attiva selettivamente le cellule sensoriali T. La riduzione della latenza riscontrata in seguito all'applicazione di PACAP-38 indica una maggiore responsività dell'animale allo stimolo test, suggerendo che PACAP-38 possa modificare le caratteristiche elettrofisiologiche esibite dai neuroni T.

Sono state quindi condotte registrazioni intracellulari da neuroni T appartenenti a gangli segmentali estratti da animali *naïve* e perfusi per 5 min con PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM. Sono stati valutati i seguenti parametri elettrofisiologici: voltaggio a riposo ( $V_m$ ), resistenza di ingresso ( $R_m$ ) misurata su impulsi iperpolarizzanti di 200 ms, 0,5 nA e ampiezza dell'iperpolarizzazione postuma (AHP). Quest'ultima caratterizza il *firing* dei neuroni T ed è responsabile di variazioni dell'efficacia sinaptica (Scuri et al., 2002; Scuri et al., 2007). I nostri dati hanno evidenziato che PACAP-38 determina una riduzione significativa dell'ampiezza della AHP che si osserva a 20 min di lavaggio senza indurre cambiamenti di  $V_m$  e  $R_m$ .

La AHP, nei neuroni T, è determinata principalmente da un incremento dell'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e solo parzialmente dall'attivazione di una conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente apamina-sensibile.

In presenza dell'inibitore apamina 1 nM PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM si è dimostrato in grado di ridurre l'ampiezza della AHP, indicando che l'azione del neuropeptide coinvolge una modulazione della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.

Il fatto che gli effetti di PACAP-38 si manifestino dopo 20 min dall'applicazione suggerisce che il neuropeptide attivi una cascata di trasduzione del segnale intracellulare. Allo scopo di comprendere i meccanismi intracellulari attivati da PACAP-38, sono stati condotti esperimenti per valutare la via dei secondi messaggeri attivata dal neuropeptide: l'utilizzo di LY 83583 0,1  $\mu\text{M}$ , un bloccante delle guanilato ciclasti, ha dimostrato che non è coinvolta la via del guanosin monofosfato ciclico; mentre esperimenti in cui è stato utilizzato il bloccante dell'adenilato ciclasti

MDL12330A 1 $\mu$ M hanno messo in evidenza un probabile coinvolgimento della via dell'adenosin monofosfato ciclico (cAMP).

Dai nostri risultati emerge che PACAP-38 attraverso la via del cAMP modifica l'integrazione sensoriale operata dai neuroni T producendo un effetto sensitizzante in risposta alle lievi stimolazioni tattili che inducono il nuoto nella sanguisuga.

## INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 1
PACAP-38 .....	pag. 3
Il modello sperimentale: <i>Hirudo medicinalis</i> .....	pag. 7
Anatomia .....	pag. 7
Comportamento.....	pag. 10
Le cellule T .....	pag. 14
La AHP nelle cellule T.....	pag. 17
SCOPO della TESI.....	pag. 22
MATERIALI e METODI .....	pag. 24
Animali .....	pag. 24
Soluzioni .....	pag. 24
Procedura comportamentale .....	pag. 25
Registrazioni elettrofisiologiche.....	pag. 27
Analisi dei dati.....	pag. 29
RISULTATI .....	pag. 30
Effetti della somministrazione di PACAP-38 nell'induzione al nuoto .....	pag. 30
Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM sui parametri elettrofisiologici delle cellule T .....	pag. 34
Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM sulle cellule T in presenza di apamina 1 nM.....	pag. 37
Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM in presenza di LY83583 0,1 $\mu$ M .....	pag. 39
Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM in presenza di MDL12330A 1 $\mu$ M.....	pag. 42
DISCUSSIONE.....	pag. 45
BIBLIOGRAFIA .....	pag. 50

## Introduzione

Da alcuni anni lo studio delle sostanze neuromodulatorie e dei loro meccanismi d'azione suscita molto interesse per le possibili implicazioni terapeutiche che ne potrebbero derivare.

Ad esempio, gli effetti protettivi esercitati da vari fattori neurotrofici sono stati dimostrati in molte condizioni neuropatologiche (Lindvall et al., 1994; Dechant, et al., 2002), con promettenti prospettive in campo clinico.

Un neuromodulatore che recentemente ha focalizzato l'attenzione degli studiosi è il PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polipeptide*) che è il membro più antico e maggiormente conservato nella scala filogenetica della famiglia di peptidi dagli effetti pleiotropici (Shioda et al., 2006) alla quale appartengono anche VIP, secretina e glucagone (Sherwood et al., 2000).

La presenza di PACAP è stata riscontrata sia negli Invertebrati che nei Vertebrati.

PACAP esiste in due forme una di 38 amminoacidi (PACAP-38) ed una più corta di 27 amminoacidi (PACAP-27). PACAP-38 è la forma predominante nei tessuti di mammifero ed è abbondantemente espresso sia a livello periferico che nel sistema nervoso centrale.

Le funzioni attribuite a questo neuropeptide sono molteplici, dalle funzioni modulatorie dell'attività sinaptica (Roberto & Brunelli, 2000; Roberto et al., 2001; Sacchetti et al., 2001; Kandel & Abel, 1995), a funzioni neuroprotettive (Lee et al., 2001; Varhalmi et al., 2008) e antiapoptotiche (Dejda et al., 2005).

I molti dati presenti in letteratura suggeriscono un suo promettente impiego nelle patologie neurodegenerative nelle quali è presente un deterioramento delle capacità mnemoniche e cognitive. Questo, però, implica necessariamente una conoscenza approfondita dei meccanismi d'azione alla base dei molteplici effetti di PACAP-38.

È diventato quindi fondamentale comprendere nel dettaglio tali meccanismi.

Un buon modello sperimentale, per questo tipo di indagine, è rappresentato dalla sanguisuga *Hirudo medicinalis* che per la sua semplicità anatomica e le sue caratteristiche fisiologiche si presta all'indagine dei vari aspetti delle funzioni del sistema nervoso, dai meccanismi di apprendimento e memoria alle modificazioni cellulari che avvengono a livello dei circuiti neurali. Infatti, *H. medicinalis* presenta atti comportamentali piuttosto complessi i cui circuiti neurali sono stati ben identificati ed è quindi possibile correlare i cambiamenti del comportamento con le modificazioni cellulari che si instaurano nelle reti neurali.

Nel presente lavoro di tesi, sono stati analizzati gli effetti e i possibili meccanismi di azione di PACAP-38 sull'integrazione di segnali sensoriali tattili in grado di evocare un atto comportamentale: l'induzione al nuoto, utilizzato anche per indagare i meccanismi alla base dell'apprendimento.

## PACAP-38

PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polipeptide*) è un neuropeptide appartenente alla famiglia di secretina e VIP (Miyata et al., 1989) che è stato isolato per la prima volta dall'ipotalamo ovino (Arimura, 1992).

Si conoscono due forme distinte di questo neuropeptide: PACAP-38 e PACAP-27 con 38 e 27 aminoacidi rispettivamente. La forma prevalente nei tessuti di mammifero è PACAP-38.

Alti livelli di PACAP si trovano nell'ipotalamo; tuttavia, esso è contenuto anche in neuroni non ipotalamici e in aree periferiche del sistema nervoso (SN) (Arimura, 1991).

Tra i peptidi di piccole dimensioni, PACAP può essere considerato quello maggiormente conservato lungo la scala filogenetica. La sua sequenza aminoacidica è totalmente conservata in molte specie di mammifero (uomo, topo, ratto, pecora e cavia).

In molti vertebrati inferiori (lucertola *Gila monster*, anfibio *Rana ridibunda*, salmone *Onchorhynchus nerka*, e pesce gatto *Clarias macrocephalus*) è pienamente conservata la porzione N-terminale di 28 aminoacidi, responsabile dell'attività del neuropeptide. Due geni che codificano per PACAP sono stati clonati anche nel tunicato *Chelysoma productum* (McRory & Sherwood, 1997).

Nel 1995, Feany e Quinn hanno identificato in *Drosophila melanogaster* un peptide omologo a PACAP e, recentemente, alcuni studi hanno evidenziato la presenza di PACAP in altre specie di invertebrato: negli anellidi *Lumbricus polyphemus* (Somogyvári-Vigh et al., 2000), *Eisenia fetida* e *Lumbricus terrestris* (Molnár et al., 2006; Molnár et al., 2008) e nel mollusco *Helix pomatia* (Hernádi et al., 2008).

Il fatto che PACAP sia presente in molti distretti corporei degli organismi e che la sua sequenza aminoacidica sia filogeneticamente conservata, suggerisce che il neuropeptide possa essere coinvolto in molteplici funzioni fisiologiche di base

Una vasta letteratura dimostra come PACAP-38 agisca da neuromodulatore in

diverse regioni del sistema nervoso.

Nel ratto, PACAP-38 stimola presinapticamente l'attività colinergica dell'ippocampo, aumentando il rilascio di acetilcolina che è altamente  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente (Arimura, 1991); inoltre, è nota la sua azione eccitatoria su recettori glutammatergici NMDA di neuroni corticali di topo (Martin et al., 1995; Stella & Magistretti, 1996; Liu & Madsen, 1997; McDonald et al., 2005; McDonald et al., 2007).

PACAP-38 è capace, a basse dosi, di aumentare il rilascio di norepinefrina nel nucleo paraventricolare di ratto (Huang et al., 1996) e di stimolare nelle cellule cromaffini la secrezione di catecolamine (Przywara et al., 1996); l'applicazione esogena di PACAP-38 aumenta sia l'ampiezza che la frequenza di correnti postsinaptiche eccitatorie in neuroni del nucleo soprachiasmatico del cervello di topo (Michel et al., 2006).

Molti studi hanno evidenziato il coinvolgimento di PACAP-38 in fenomeni di plasticità sinaptica.

Evidenze a tale riguardo sono state ottenute da Roberto e Brunelli, (2000) e Roberto et al., (2001): da tali studi è emerso che PACAP-38, a relativamente basse concentrazioni (0,05 nM), induce un aumento dei fEPSPs nella regione CA1 dell'ippocampo di ratto, durante la trasmissione sinaptica basale, ma non dopo l'induzione della *long-term potentiation* (LTP) mediante stimolazione tetanica. Si è osservato, inoltre, che tale effetto è dose-dipendente (concentrazioni di 0,025-0,01 nM, non hanno effetto; 1  $\mu\text{M}$  induce una depressione persistente dei fEPSPs; concentrazioni intermedie, 0,1-0,5  $\mu\text{M}$ , producono un iniziale decremento dei fEPSPs seguito da un incremento) e può risultare dagli stessi meccanismi che caratterizzano l'LTP tetano-indotta, in quanto è bloccato dall'atropina (bloccante dei recettori colinergici) e attenuato dall'applicazione di APV (bloccante dei recettori glutammatergici di tipo NMDA).

La capacità di PACAP-38 di indurre depolarizzazione in neuroni del campo CA1 determinando facilitazione di lunga durata, è emersa anche da esperimenti di *whole-cell patch-clamp* condotti da Di Mauro e collaboratori (2003).

A conferma del coinvolgimento di PACAP-38 nei processi che sottostanno all'elaborazione di tracce mnemoniche Sacchetti e collaboratori, nel 2001, hanno

dimostrato che questo neuropeptide, a basse dosi, influenza l'apprendimento nei ratti. Animali a cui era stato somministrato PACAP-38 intracerebroventricularmente alla concentrazione di 0,2 ng in 10  $\mu$ L di soluzione salina (corrispondente ad una concentrazione endocerebrale di 0,05 e 0,5 nM in grado di modificare significativamente l'eccitabilità neuronale nella regione CA1 di ippocampo (Roberto & Brunelli, 2000), immediatamente dopo la sessione di acquisizione del paradigma di *passive avoidance response* (PAR), mostravano, quando saggiati dopo 48 h e 96 h dall'addestramento, un significativo miglioramento del PAR. Anche in questo caso, l'effetto è risultato dose-dipendente: non si aveva effetto sia a dosi inferiori che a dosi superiori di 0,2 ng/10  $\mu$ L.

Evidenze sperimentali riguardo il coinvolgimento di PACAP-38 nei processi di plasticità sinaptica sono state ottenute anche negli Invertebrati.

In molti Invertebrati la mancanza di un peptide omologo al PACAP dei Mammiferi, determina deficit nell'apprendimento (Kandel & Abel, 1995).

Ad esempio, in *Drosophila*, durante esperimenti di apprendimento olfattivo in cui gli animali imparavano ad evitare un particolare odore a cui era associato uno stimolo elettrico nocicettivo, è stato dimostrato che i moscerini mutanti per il gene *amnesiac*, manifestavano *deficit* nel consolidamento mnemonico (Kandel & Abel, 1995; Feany & Quinn, 1995; Davis, 1996; Hashimoto et al., 2002).

Recentemente, Molnàr e collaboratori, (2008), a dimostrazione del fatto che PACAP agisce come neurotrasmettitore e neuromodulatore anche nel sistema nervoso dell'oligochete *Eisenia fetida*, hanno individuato un alto numero di recettori di PACAP sia nelle membrane pre- che post-sinaptiche della corda nervosa ventrale di questo anellide.

Evidenze sperimentali attribuiscono a PACAP anche effetti neurotrofici (Meyer, 2006; Watanabe et al., 2007).

Recentemente è stato dimostrato che PACAP-38 ha effetti neurotrofici durante lo sviluppo della corteccia cerebellare. In particolare, Vaudry e collaboratori, nel 1999, hanno dimostrato che PACAP-38 stimola la proliferazione delle cellule dei granuli cerebellari, proliferazione che viene a mancare se si bloccano i recettori del neuropeptide; inoltre, la somministrazione di PACAP-38 determina un significativo incremento nel volume della corteccia cerebellare.



In uno studio di Lee e collaboratori (2001), è stato osservato che le cellule progenitrici degli oligodendrociti (OLP) esprimono i recettori per PACAP-38 *in vivo* e *in vitro* e l'aggiunta di PACAP-38 a colture di OLP determina un innalzamento dei livelli di cAMP stimolandone la proliferazione.

Molti studi evidenziano anche un ruolo neuroprotettivo del peptide (Dejda et al., 2005). È nota la capacità di PACAP-38 di proteggere i neuroni granulari di cervelletto dalla apoptosi (Villalba et al., 1997; Mei et al., 2004); effetti simili sono stati osservati a livello dei neuroni del ganglio ciliare parasimpatico di pollo (Pugh & Margiotta, 2006) e nelle cellule di Schwann di ratto (Castorina et al., 2008).

Questi effetti neurotrofici e neuroprotettivi di PACAP-38 non sono stati evidenziati solo nei Vertebrati ma anche in alcuni modelli di Invertebrato. Ad esempio, è stato visto che PACAP-38 o un peptide omologo ha effetti trofici durante la rigenerazione del sistema nervoso in *Eisenia fetida* (Varhalmi et al., 2008).

Pirger e collaboratori (2008) hanno rilevato l'azione anti-apoptotica di PACAP-38 anche nella ghiandola salivare di *Helix pomatia*.

Numerosi studi sono rivolti a comprendere quali siano i meccanismi molecolari attraverso cui PACAP-38 esplica i suoi molteplici effetti.

I recettori di PACAP-38 conosciuti nei Mammiferi e in alcuni Invertebrati sono classificati in due categorie: i recettori di tipo I (PAC<sub>1</sub>-R, ne esistono 8 sottotipi derivati da *splicing* alternativo) e i recettori di tipo II (esistono i sottotipi VPAC<sub>1</sub>-R, VPAC<sub>2</sub>-R) (Vaudry et al., 2000). Nel SNC dei Mammiferi sono distribuiti, in particolare, in strutture conosciute per essere coinvolte in processi mnemonici, quali amigdala, ippocampo, corteccia entorinale e nucleo *accumbens* (Ambrogio Lorenzini et al., 1999). Sono tutti costituiti da 7 domini transmembrana ed accoppiati a proteine G. Tutti i tipi di proteine recettoriali sono positivamente accoppiate all'AC (escluso il caso in cui interagisce con il sottotipo PAC<sub>1</sub>-R-TM4); i recettori di tipo I attivano anche la via intracellulare del secondo messaggero inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>), attivando PLC.

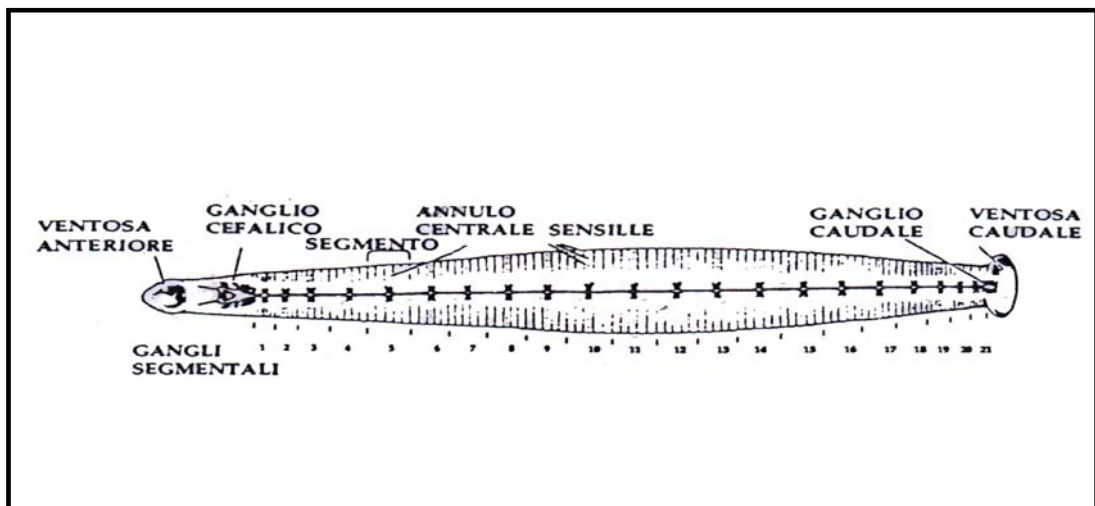
## Il modello sperimentale: *Hirudo medicinalis*

La sanguisuga *H. medicinalis* rappresenta un buon modello sperimentale per le sue caratteristiche fisiologiche abbastanza complesse a cui corrisponde una semplicità anatomica che consente facilmente l'approccio sperimentale. Per questi motivi è stata utilizzata per indagare vari aspetti della funzionalità del sistema nervoso, dai fenomeni di apprendimento e memoria a livello comportamentale, ai meccanismi di integrazione che possono avvenire a livello delle reti neurali.

### Anatomia

La sanguisuga *H. medicinalis* è un anellide appartenente alla famiglia Hirudinidae; è un ectoparassita ematofago e vive principalmente in acque dolci, con capacità di movimento sia in acqua che su un substrato solido.

La sanguisuga presenta un'organizzazione metamerica del corpo, tipica del *phylum* degli anellidi, e il sistema nervoso rispecchia questa organizzazione (**Fig. 1**).

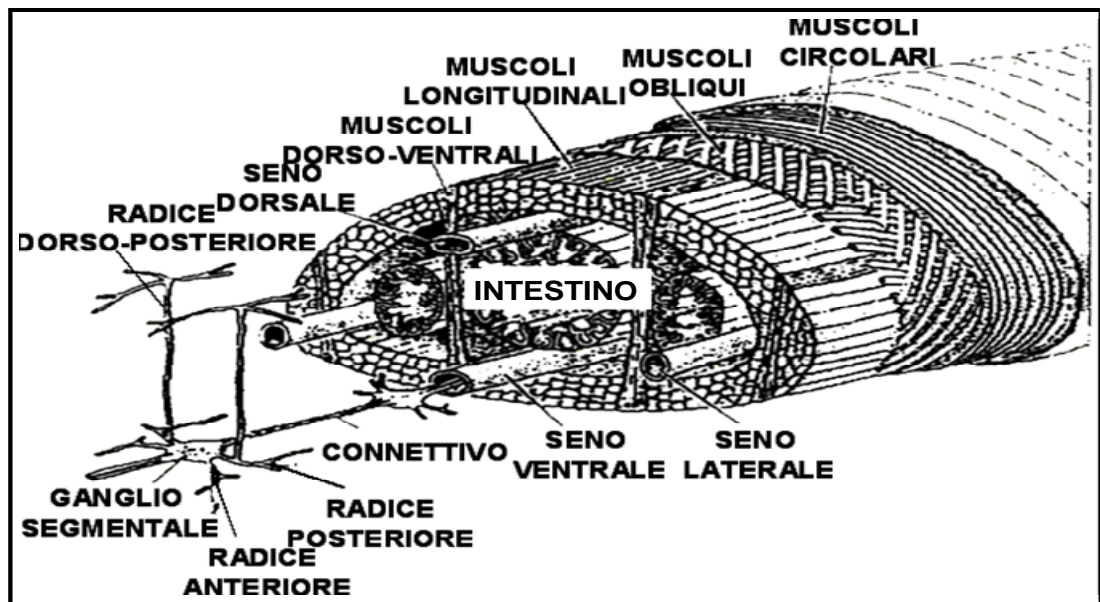


**Fig. 1:** Schema del sistema nervoso gangliare della sanguisuga *Hirudo medicinalis* (modificata da: Kuffler & Nicholls, 1976)

Il corpo è formato dalla ripetizione di 34 segmenti metamerici; fanno eccezione i 2 segmenti alle estremità, formati dalla fusione di più metameri, i quali presentano ventose. La ventosa rostrale, o anteriore, è specializzata per nutrirsi del sangue dell'ospite mentre la ventosa caudale, o posteriore, è specializzata nell'ancorarsi al substrato durante l'esplorazione dell'ambiente circostante (*crawling*).

Il sistema nervoso è composto da una catena di 21 gangli segmentali connessi anteriormente ad una massa cefalica e posteriormente ad una massa caudale. La massa cefalica deriva dalla coalescenza di sei gangli: è costituita da una porzione sopraesofagea, composta dall'unione di 2 gangli e, centralmente, da una porzione subesofagea composta dalla coalescenza di 4 gangli segmentali. L'insieme costituisce il cingolo periesofageo che coordina le funzioni motorie e innerva la ventosa anteriore (Muller et al., 1981). La massa nervosa caudale è formata dalla fusione di sette gangli ed innerva la ventosa posteriore.

La catena gangliare decorre medialmente per tutta la lunghezza dell'animale; è disposta centralmente all'apparato digerente ed è contenuta all'interno del seno venoso ventrale, avvolto da tessuto connettivo (**Fig. 2**).

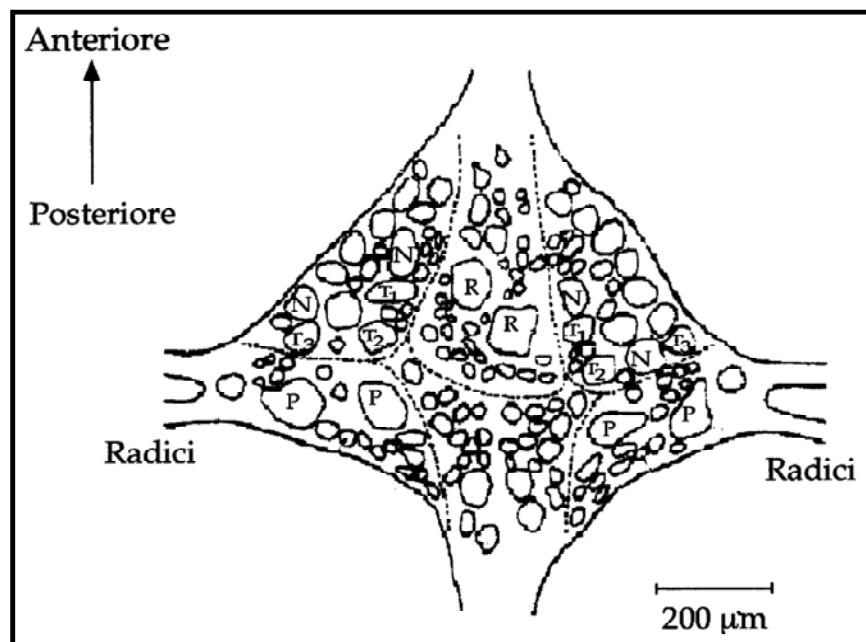


**Fig. 2:** Schema tridimensionale della sezione trasversale della sanguisuga. Sono evidenti la corda nervosa, le radici laterali dei gangli segmentali e la loro relazione con le altre strutture del corpo (modificata da: Muller et al., 1981).

Ciascun ganglio della catena risulta costituito da circa 400 neuroni. Fanno eccezione il 5° e il 6° ganglio, che innervano gli organi sessuali e che sono costituiti da circa 700 cellule nervose (Macagno, 1980).

L'organizzazione neuronografica dei gangli segmentali si ritrova pressoché inalterata in tutta la corda nervosa.

All'interno di ogni ganglio, i neuroni sono contenuti in sei pacchetti, o compartimenti follicolari, formati da cellule gliali i cui prolungamenti avvolgono i corpi cellulari dei neuroni. In ogni ganglio si riconoscono due pacchetti antero-laterali, 2 postero-laterali, e 2, rispettivamente, antero- e postero-mediali (**Fig. 3**).



**Fig. 3:** Schema del lato ventrale di un ganglio segmentale. Sono evidenti i neuroni sensoriali T, P e N e le cellule serotoninergiche di (R) (modificata da: Muller et al., 1981).

In un ganglio segmentale è riconoscibile un numero ben determinato di neuroni motori, sensoriali e interneuroni che sono organizzati in reti neurali che sottendono tutti gli atti comportamentali che l'animale esibisce.

Ad esempio, 34 è il numero dei motoneuroni per ganglio. Particolarmente studiati sono quelli responsabili della contrazione muscolare durante il nuoto e il

motoneurone L. Questo si trova sul lato dorsale del ganglio e innerva la muscolatura longitudinale che si contrae quando l'animale accorcia il corpo (*shortening*).

Tre diverse tipologie di cellule sensoriali veicolano tre differenti modalità sensoriali.

In tutto, ci sono 14 cellule sensoriali per ganglio, distinguibili dal lato ventrale:

- 6 cellule T (tre per ogni pacchetto antero-laterale), denominate T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, che rispondono a lievi stimoli tattili applicati alla cute dell'animale;
- 4 cellule P (due per ogni pacchetto postero-laterale), che si attivano in seguito a stimoli pressori;
- infine, sono presenti 4 cellule N (due per ogni pacchetto antero-laterale), che rispondono a stimoli di natura nocicettiva (Baylor & Nicholls, 1969a; Van Essen, 1973).

Tra gli interneuroni ricordiamo:

- i neuroni serotoninergici in numero che varia da 7 a 9: tra questi sono particolarmente distinguibili 2 cellule con diametro di circa 80 µm, le cellule giganti di Retzius. La 5HT regola la produzione di muco da parte della cute (Lent, 1973) e determina il rilassamento dei muscoli longitudinali del corpo (Mason et al., 1979) e lo stato d'allerta dell'animale (Kristan, 1983). Queste due cellule sono connesse tra loro da sinapsi elettriche (Hagiwara & Morita, 1962; Eckert, 1963) che sono modulate in senso disaccoppiante da 5HT e dopamina (Colombaioni & Brunelli, 1988);
- gli interneuroni S costituiscono il "sistema a rapida conduzione" che permette all'impulso di propagarsi velocemente per tutta la catena gangliare tramite sinapsi elettriche non rettificanti.

## **Comportamento**

Nonostante la semplicità del suo sistema nervoso, la sanguisuga *H. medicinalis* presenta atti comportamentali piuttosto complessi regolati da circuiti neuronali che sono ben conosciuti ed è quindi possibile correlare cambiamenti del comportamento con modificazioni dell'attività cellulare. Inoltre, il suo sistema nervoso è adatto agli studi sperimentali, poiché caratterizzato da neuroni organizzati in circuiti costituiti da un numero relativamente basso di elementi accessibili all'indagine elettrofisiologica

e cellulare. L'animale mostra vari atti comportamentali quali il *crawling*, lo *shortening*, il *local bending* e il nuoto (Shaw & Kristan, 1999; Kristan et al., 2000; Friesen & Cang, 2001; Brodfuerhrer & Thorogood, 2001).

Il *crawling* è un comportamento ritmico caratterizzato da 2 fasi principali, estensione del corpo e contrazione del corpo, tipicamente coordinato dall'attacco e il rilascio delle 2 ventose (Cacciatore et al., 2000).

Lo *shortening* è un accorciamento generalizzato del corpo dell'animale, indotto in risposta a forti stimoli fotici o nocicettivi (Bagnoli et al., 1975; Boulis & Sahley, 1988) per contrazione simultanea dei muscoli longitudinali presenti in tutti i segmenti corporei.

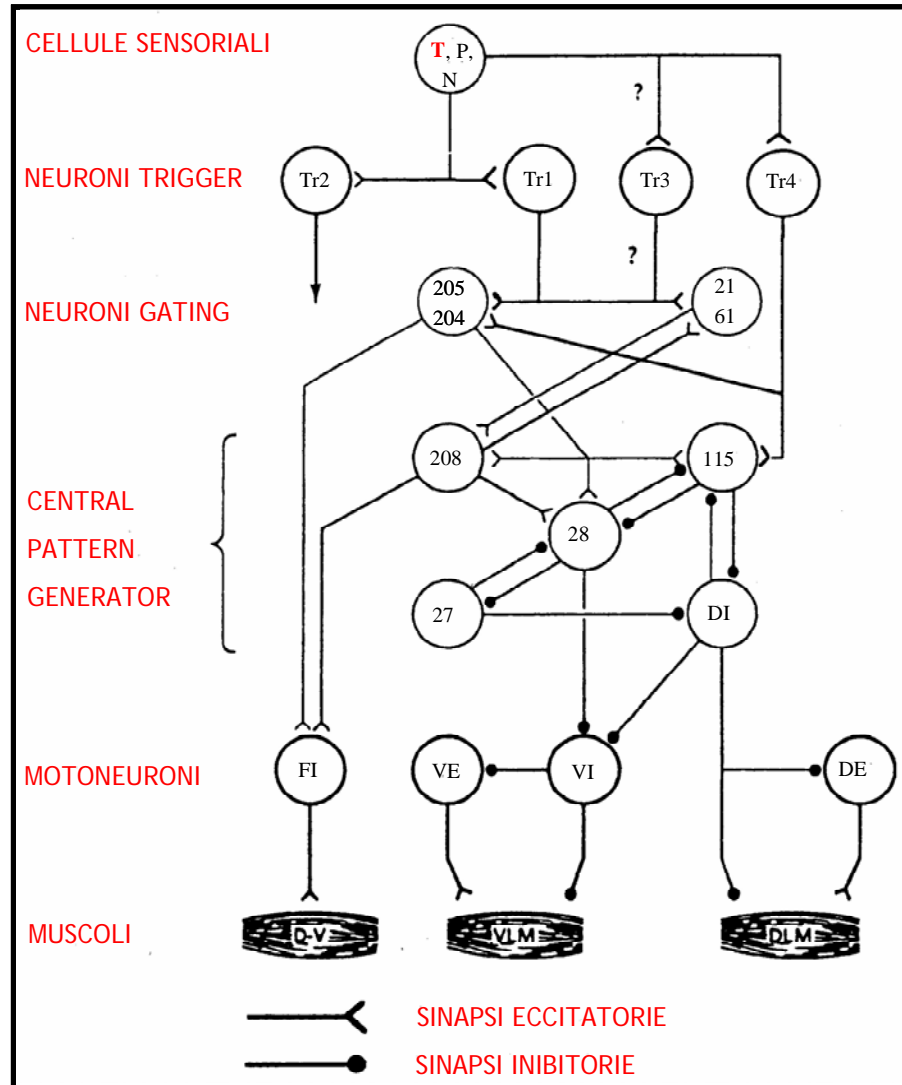
Il *local bending* è la flessione del corpo compiuta dall'animale in risposta ad una lieve stimolazione meccanica della cute, per contrazione dei muscoli longitudinali del lato stimolato e rilassamento di quelle del lato opposto nell'ambito del segmento interessato dalla stimolazione (Lockery & Kristan, 1990a, 1990b, 1991).

Il nuoto della sanguisuga intatta si esprime con comportamenti episodici. Il nuoto inizia in seguito ad una vasta gamma di *inputs* sensoriali tra cui sono inclusi la stimolazione tattile della parete corporea e i movimenti dell'acqua (Kristan et al., 2005). Il nuoto consiste di movimenti ondulatori del corpo sul piano dorso-ventrale. Tali movimenti vengono prodotti dalla contrazione alternata dei muscoli longitudinali, dorsali e ventrali di ogni segmento. La contrazione di ciascun segmento precede sempre quella del segmento successivo adiacente, assicurando una progressione di contrazione corporea in senso rostro-caudale (Debski & Friesen, 1985; Kristan, 1983) (**Fig. 4**).

Un importante contributo allo studio delle modificazioni cellulari che avvengono a seguito delle modificazioni comportamentali è stato fornito dagli studi condotti sul modello comportamentale dell'induzione al nuoto.

In animali in cui sia stata rimossa chirurgicamente l'inibizione tonica esercitata dal ganglio cefalico (animale "quasi intatto"), la stimolazione della cute della porzione caudale con lievi stimoli elettrici è in grado di indurre un ciclo di nuoto con un intervallo di tempo (latenza) tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio dell'episodio di nuoto pressoché costante. Questo paradigma di stimolazione e di risposta

dell'animale è stato utilizzato in passato per indurre forme di apprendimento non associativo quali abitudine, sensitizzazione e disabitudine e studiarne i meccanismi cellulari e molecolari.



**Fig. 4:** Circuito del nuoto. Il circuito neurale del nuoto è costituito da gruppi di neuroni suddivisi a seconda della loro funzione: **Neuroni Sensoriali P, N e T** la cui attivazione selettiva, mediante stimolazione della cute dell'animale, induce episodi di nuoto; **Neuroni Trigger** identificati nel ganglio subesofageo, se stimolati elettricamente producono o fanno cessare gli episodi di nuoto la cui durata è pressoché indipendente dall'entità della stimolazione; **Neuroni Gating** interneuroni in grado di iniziare e mantenere i movimenti del nuoto; **Central Pattern Generator** interneuroni oscillatori collegati tra loro da sinapsi eccitatorie ed inibitorie in grado di generare, attraverso un'inibizione ciclica ricorrente, il tipico ritmo del nuoto; **Motoneuroni** sui quali l'alternanza delle influenze eccitatorie ed inibitorie determina la ritmica contrazione che caratterizza il nuoto della sanguisuga. (modificata da Kristan et al., 2005)

Le variazioni della latenza possono essere considerate indice dell'instaurarsi di queste forme di apprendimento nel senso che, un aumento della latenza con cui l'animale risponde agli stimoli è indice di una ridotta responsività (abitudine), mentre una riduzione della latenza descrive un aumento della responsività dell'animale agli stimoli (sensitizzazione).

È possibile indurre abitudine, ovvero decremento della risposta natatoria indicato dal progressivo aumento della latenza al nuoto, con la somministrazione di 15 stimoli elettrici ad intervalli di 1/min (Zaccardi et al., 2001). Sensitizzazione e disabitudine si ottengono sottoponendo le sanguisughe a 15 spazzolate (*brushing*) sul dorso, quale stimolo nocicettivo. Una netta riduzione della latenza misurata alla presentazione dello stimolo elettrico lieve (stimolo test) subito dopo l'evento nocicettivo è considerata indice di avvenuta sensitizzazione mentre se, tale diminuzione della latenza si ha su una risposta precedentemente abituata (Zaccardi et al., 2001), si parla di disabitudine.

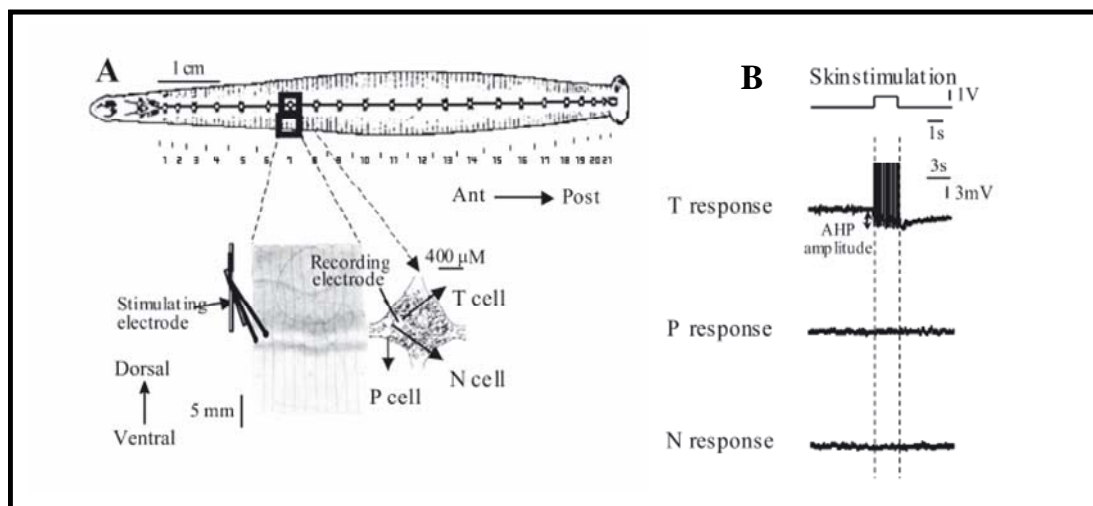
Gli studi su queste forme di apprendimento hanno consentito di individuare alcuni dei meccanismi alla base dell'apprendimento non associativo. A livello comportamentale sono stati condotti esperimenti iniettando varie sostanze nell'animale, prima che fosse sottoposto ad una sessione di apprendimento. Tali esperimenti hanno consentito di identificare nell'abitudine il coinvolgimento del calcio sia extra- che intra-cellulare, che porta all'attivazione della fosfolipasi  $A_2$  e alla conseguente liberazione di acido arachidonico (AA) che è metabolizzato dalla 5-lipossigenasi (Brunelli et al., 1996).

Per quanto riguarda la sensitizzazione e la disabitudine nell'induzione al nuoto, così come è stato visto anche nello *shortening* (Burrell & Sahley, 2005), il neurotrasmettitore endogeno serotonina (5HT) svolge un ruolo fondamentale. Come è stato dimostrato da Zaccardi et al., (2004), nell'induzione al nuoto, la 5HT media la sensitizzazione e la disabitudine attraverso un aumento dei livelli intracellulari di cAMP. Infatti, iniezioni di 5HT o di un analogo del cAMP permeante le membrane cellulari, l'8-bromo-adenosin monofosfato ciclico, inducono sensitizzazione e disabitudine così come il *brushing*. L'iniezione di metisergide, bloccante generico dei recettori serotoninergici, invece, elimina il potenziamento osservato nella



sensitizzazione e riduce drasticamente la disabitudine; l'iniezione di MDL-12330A, bloccante dell'adenilato ciclasi, impedisce la riduzione della latenza in seguito ad applicazione di 5HT o in seguito a stimolazione nocicettiva (Zaccardi et al., 2004).

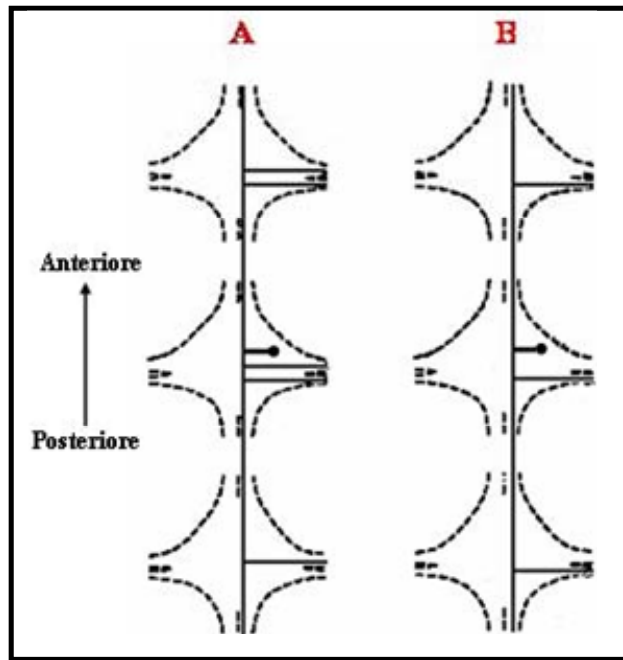
La stimolazione elettrica utilizzata come stimolo test durante lo studio dell'induzione al nuoto attiva selettivamente i neuroni sensoriali tattili T. Come mostrato in **Fig. 5**, in un preparato semi-intatto (**Fig. 5A**), costituito da un ganglio segmentale mantenuto collegato ad una porzione di cute contenente l'emisegmento laterale corrispondente, la stimolazione elettrica capace di indurre il nuoto attiva selettivamente le cellule T (**Fig. 5B**).



**Fig. 5:** Attivazione selettiva delle cellule T in seguito a stimolazione elettrica lieve della cute. Spiegazione nel testo. (modificata da: Scuri et al., 2007).

### Le cellule T

Le cellule T sono neuroni unipolari che presentano un albero neuritico ben ramificato e, all'interno del ganglio, sono disposte simmetricamente: 3 nel pacchetto laterale di destra e 3 nel pacchetto laterale di sinistra (**Fig. 6**). È possibile distinguere, in ciascun lato, tre diversi sottotipi di cellula T in base alla localizzazione del loro campo recettoriale. Vengono quindi denominate diversamente: le cellule  $T_1$  innervano la zona ventrale della cute, le  $T_2$  hanno diramazioni nella zona laterale e le  $T_3$  innervano la porzione di cute dorsale.



**Fig. 6:** Schema delle ramificazioni neuritiche delle cellule T. **A:** schema delle ramificazioni di una cellula del tipo  $T_1$  o  $T_2$ . **B:** schema delle ramificazioni di una cellula  $T_3$  (modificata da: Yau, 1976).

Tutti i contatti sinaptici tra neuriti, principalmente di tipo asso-assonico, avvengono nella zona centrale del ganglio (Coggeshall & Fawcett, 1964), detta neuropilo. Ogni cellula T è in grado di attivare altre 11 cellule T: gli altri 5 neuroni T nello stesso ganglio e le 6 cellule T omolaterali che si trovano nei gangli adiacenti anteriore e posteriore.

L'attivazione delle 8 cellule T ipsilaterali sembra essere diretta (Baylor & Nicholls, 1969a), mentre, l'attivazione delle 3 cellule T controlaterali è legata anche all'attività di un interneurone inibitorio.

Le connessioni sinaptiche tra i neuroni T sono sia di tipo elettrico che chimico. Le sinapsi elettriche sono di tipo asso-assonico e sono state, nel corso degli anni, oggetto di molti studi. In particolare, è emerso che gli impulsi depolarizzanti attraversano la connessione in entrambi i sensi, mentre quelli iperpolarizzanti non attraversano la sinapsi (doppia rettificazione). Questo avviene a livello sia delle connessioni tra cellule dello stesso ganglio sia delle connessioni tra cellule di gangli adiacenti (Baylor & Nicholls, 1969b; Acklin, 1988).

Il potenziale d'azione che nasce in una cellula T porta, in un'altra cellula T, ad una rapida depolarizzazione, senza ritardo sinaptico (con una latenza inferiore a 0,5 ms),

che spesso giunge a soglia e a cui fanno seguito un potenziale post-sinaptico depolarizzante (EPSP), a più lunga latenza, e un potenziale post-sinaptico iperpolarizzante (IPSP). Grazie ad esperimenti condotti in presenza di  $\text{MgCl}_2$  20 mM (inibitore delle sinapsi chimiche) è stato possibile mettere in evidenza che la depolarizzazione rapida che si instaura dipende dall'accoppiamento elettrico (Nicholls & Purves, 1970). Infatti, in queste condizioni sperimentali, la rapida depolarizzazione permane, mentre scompaiono sia l'EPSP che l'IPSP di natura chimica. Quest'ultimo è dovuto ad una conduttanza cloro attivata da un interneurone inibitorio comune alle tre cellule T di uno stesso pacchetto del ganglio (Baylor & Nicholls, 1969a); della componente chimica di natura eccitatoria che connette tra loro queste cellule, c'è ancora molto da chiarire. Baylor & Nicholls (1969a) hanno ipotizzato che siano, contrariamente alle sinapsi elettriche, di-sinaptiche o polisinaptiche.

Muller & McMahan (1976) hanno individuato, con tecniche di microscopia elettronica, delle varicosità lungo le terminazioni secondarie e terziarie che possono essere sede di sinapsi chimiche sia pre- che post-sinaptiche.

Poco si conosce riguardo la natura del neurotrasmettitore rilasciato dai neuroni T sui recettori espressi a livello postsinaptico, anche se recenti studi indicano che gli effetti su neuroni *followers* si esplicano attraverso recettori glutammatergici anche di tipo NMDA (Burrell & Li, 2008 )

Le cellule T presentano un particolare profilo di scarica caratterizzato da un treno di potenziali d'azione a cui fa seguito una deflessione del potenziale di membrana in senso iperpolarizzante definita iperpolarizzazione postuma o AHP (*afterhyperpolarization*).

La AHP è presente in tutti i meccanocettori di *H. medicinalis* ed è sostenuta da due componenti: l'attivazione di una conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente e l'incremento della attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi. In particolare: nelle cellule N la componente principale è la conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente; nelle cellule P entrambe le componenti sono coinvolte in ugual misura e nelle cellule T, la AHP è sostenuta prevalentemente dall'azione della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e parzialmente, per circa il 20-25%, dalla  $\text{gK}/\text{Ca}$  (Jansen & Nicholls, 1973; Van Essen, 1973).

## **La AHP nelle cellule T**

Questa caratteristica elettrofisiologica è presente non solo nei meccanocettori della sanguisuga ma la troviamo in molti tipi di cellula nervosa sia negli Invertebrati che nei Vertebrati. Caratterizza, ad esempio, l'attività elettrica dei recettori da stiramento nei crostacei (Nakajima & Takahashi, 1966) e delle cellule nervose di *Helix pomatia* (Kerkut & Thomas, 1965); nel ratto, i motoneuroni del nucleo dorsale del vago (Sah & McLachan, 1992), i neuroni neostriatali (Pineda et al., 1992) e le cellule piramidali e gli interneuroni dell'ippocampo (Storm, 1987; Storm, 1989; Williamson & Alger, 1990) presentano iperpolarizzazione sia dopo singolo potenziale d'azione, sia dopo un treno di potenziali d'azione.

Due sono le principali componenti responsabili della genesi di questo fenomeno: una componente precoce ed una tardiva. La componente precoce è dovuta prevalentemente all'attivazione di correnti  $K^+$  voltaggio-dipendenti. La componente tardiva della AHP è dovuta all'attivazione di conduttanze  $K^+/Ca^{2+}$ -dipendenti più lente, generate dall'entrata di  $Ca^{2+}$  durante il potenziale d'azione (Gustafsson, 1974; Hill et al., 1985; Sah, 1996). In molti tipi neuronali è presente un'altra componente responsabile della genesi della AHP: la  $Na^+/K^+$ -ATPasi. Dopo una sostenuta scarica di potenziali d'azione, i cambiamenti della distribuzione ionica che ne risultano determinano un aumento dell'attività della  $Na^+/K^+$ -ATPasi che si traduce, a livello elettrofisiologico, in un'iperpolarizzazione postuma del potenziale di membrana che può persistere per diversi secondi.

Nelle cellule T di *H. medicinalis* l'albero neuritico estremamente ramificato e la modulazione di un parametro elettrofisiologico come la AHP possono rappresentare un filtro per la trasmissione delle informazioni lungo i prolungamenti della cellula nervosa. Nelle cellule T, è stato dimostrato che la AHP crea, in una via precedentemente attivata, dei blocchi di conduzione nei punti di diramazione assonale dove i processi neuritici di calibro minore convergono in quelli di calibro maggiore (*branching points*). Una conseguenza di ciò è che i potenziali d'azione evocati in periferia possono non raggiungere il soma della cellula T, perché non sono in grado di propagarsi oltre il *branching point* (Baylor & Nicholls, 1969b; Van Essen, 1973) e i potenziali d'azione che si propagano dal soma verso i terminali

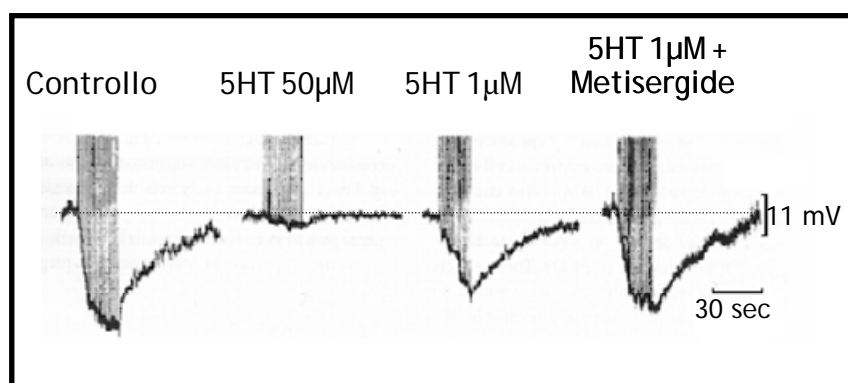
sinaptici possono essere bloccati in funzione della frequenza di scarica e della morfologia dei terminali (Lombardo et al., 2004; Cataldo et al., 2005).

Quindi, la AHP può indurre alterazioni della configurazione dei potenziali d'azione, può determinare un innalzamento della soglia di attivazione della cellula e provocare inversione dei potenziali sinaptici oppure influenzare la quantità di trasmettitore rilasciato dai terminali sinaptici.

Nelle cellule T, la stimolazione meccanica del loro campo recettoriale, o l'iniezione intracellulare di un treno di impulsi depolarizzanti (200 msec, 2,5 Hz), della durata complessiva di 3 secondi (intensità di corrente fra 0,4 e 0,8 nA), produce una AHP che dura per diversi secondi. Maggiore è la durata della scarica, più ampia e duratura risulta essere la AHP.

In passato è stato dimostrato che l'ampiezza della AHP è modulabile e che tale modulazione è strettamente legata alla modulazione dell'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.

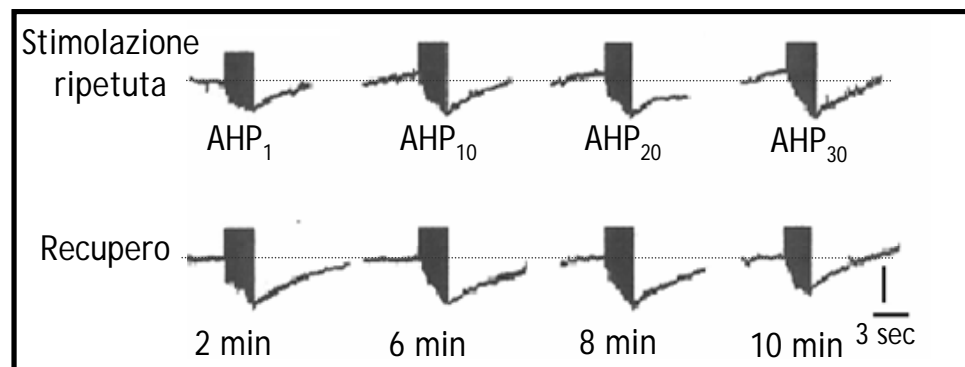
L'ampiezza della AHP può essere modulata in senso negativo da parte del neurotrasmettitore endogeno 5HT (**Fig. 7**). Sia la somministrazione di questa monoammina che la stimolazione delle cellule serotoninergiche di Retzius determinano una netta riduzione dell'ampiezza della AHP (Belardetti et al., 1984). L'effetto della 5HT è reversibile, dose-dipendente ed è bloccato dalla metisergide, un bloccante generico dei recettori serotoninergici (Belardetti et al., 1984)



**Fig. 7:** Effetto della somministrazione della 5HT e del bloccante generico dei recettori serotoninergici, metisergide, sull'ampiezza della AHP. La 5HT determina una riduzione dell'ampiezza della AHP dose-dipendente. Tale effetto è bloccato dalla metisergide (modificata da: Belardetti et al., 1984).

A livello cellulare è stato osservato, con esperimenti di tipo elettrofisiologico, che la 5HT esplica i suoi effetti attraverso il cAMP (Catarsi et al., 1993) e che il suo bersaglio d'azione è la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.

L'ampiezza della AHP può essere modulata anche in senso positivo. Scuri et al. (2002) hanno evidenziato un meccanismo di modulazione attività-dipendente. Stimolando la cellula ripetutamente, ad intervalli di tempo costanti, sia con iniezioni di treni di impulsi depolarizzanti, che inducono la AHP, sia con stimolazioni meccaniche del campo recettoriale si ha un progressivo incremento dell'ampiezza della AHP che permane anche fino a 10 min dopo il termine della stimolazione (**Fig. 8**).



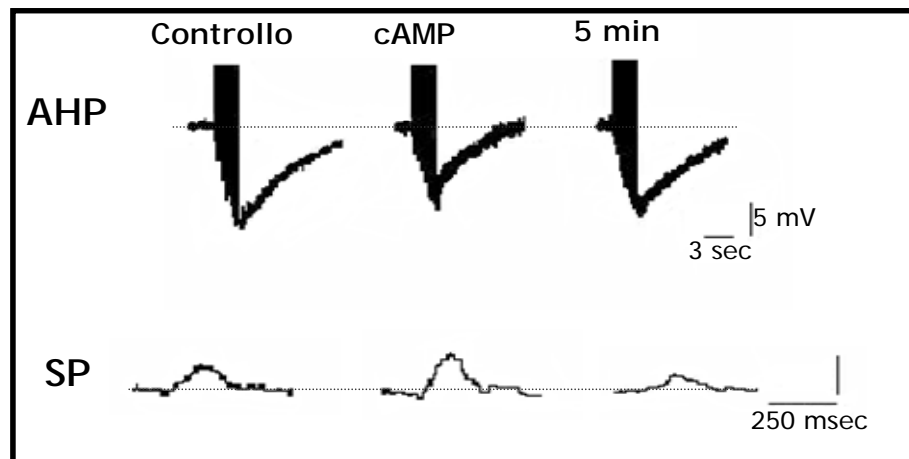
**Fig. 8:** Effetto della stimolazione ripetuta della cellula T con 30 treni di impulsi depolarizzanti della durata di 3 s sull'ampiezza della AHP. Sono mostrate le AHPs ottenute dopo il 1°, 10°, 20° e 30° treno di impulsi. Si noti il progressivo aumento dell'ampiezza della AHP. L'ampiezza della AHP recupera il suo valore iniziale dopo circa 10 min dal termine della stimolazione ripetuta (modificata da: Scuri et al., 2002)

Il potenziamento della AHP è dovuto ad un incremento dell'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, infatti si ha anche in presenza di apamina, bloccante della conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente che genera parzialmente la AHP, mentre scompare quando l'enzima di membrana è bloccato (Scuri et al., 2002).

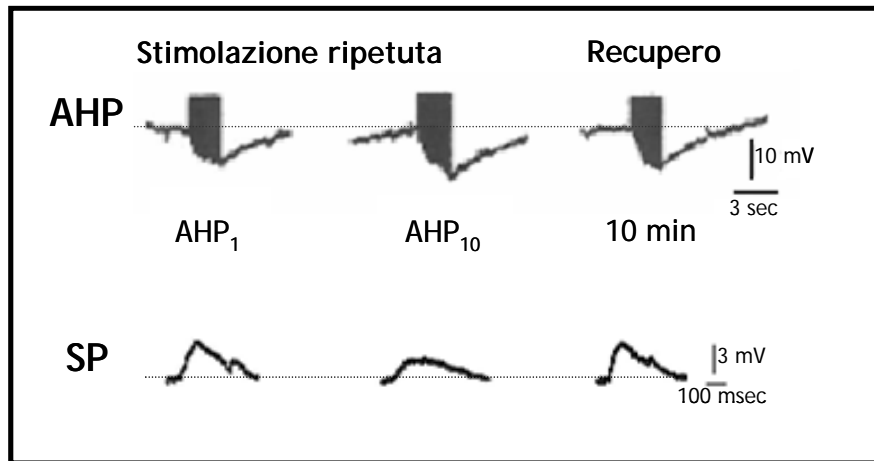
La cascata intracellulare che sottende al potenziamento dell'ampiezza della AHP è stata identificata in una particolare via di metabolizzazione dell'AA, attivata dall'entrata di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula. L'aumento della  $[\text{Ca}^{2+}]$  nel citoplasma, dovuta sia all'entrata dello ione attraverso canali  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti e nifedipina-sensibili, sia al suo rilascio dai compartimenti intracellulari (promossa da  $\text{Ca}^{2+}$ ), determina l'attivazione della fosfolipasi  $\text{A}_2$  che scinde l'AA dai fosfolipidi di

membrana. L'AA viene metabolizzato attraverso la via della 5-lipoossigenasi. I prodotti di questa via metabolica sarebbero in grado di agire (anche se ancora non è chiaro attraverso quali meccanismi molecolari) sulla pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi potenziandone l'attività e inducendo il progressivo incremento dell'ampiezza della AHP che si osserva durante la stimolazione ripetuta (Scuri et al., 2005).

La modulazione dell'ampiezza della AHP determina una modulazione della forza sinaptica tra la cellula T ed un suo *follower*. Infatti, alla riduzione dell'ampiezza della AHP, indotta ad esempio con iniezioni intracellulari di cAMP, nell'elemento presinaptico, corrisponde un aumento dell'ampiezza del potenziale sinaptico nel neurone *follower* (**Fig. 9**) (Scuri et al., 2007). Al contrario, all'aumento dell'ampiezza della AHP nell'elemento presinaptico, che si ha con la stimolazione ripetuta, corrisponde una riduzione dell'ampiezza del potenziale sinaptico (**Fig. 10**) (Scuri et al., 2002).



**Fig. 9:** Effetto della riduzione dell'ampiezza della AHP sull'ampiezza del potenziale postsinaptico registrato da un'altra cellula T considerata come *follower*. Alla riduzione dell'ampiezza della AHP, indotta dall'iniezione di cAMP nel neurone postsinaptico, corrisponde un incremento dell'ampiezza del potenziale sinaptico (SP) (modificata da: Scuri et al., 2007).



**Fig. 10:** Effetto dell'incremento dell'ampiezza della AHP sull'ampiezza del potenziale postsinaptico in un'altra cellula T presa come *follower*. Al progressivo aumento dell'ampiezza della AHP corrisponde una riduzione dell'ampiezza del potenziale postsinaptico (modificata da: Scuri et al., 2002).

Quindi le cellule T attraverso la modulazione dell'AHP rappresentano un importante sito di plasticità sinaptica.



## Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare gli effetti del neuropeptide PACAP-38 in forme di plasticità sinaptica su un modello sperimentale ben conosciuto come la sanguisuga *H. medicinalis*.

Il neuropeptide PACAP-38 è altamente conservato lungo la scala filogenetica ed è abbondantemente distribuito sia a livello periferico che a livello del sistema nervoso centrale. Nel ratto, evidenze sperimentali dimostrano che PACAP-38 ha effetti modulatori a livello della trasmissione sinaptica nell'ippocampo, struttura coinvolta nell'apprendimento e nella memoria (Roberto & Brunelli, 2000; Roberto et al., 2001; Sacchetti et al., 2001).

Nel sistema nervoso dei Mammiferi PACAP-38 è distribuito anche in altre strutture note per il loro coinvolgimento nei processi mnemonici quali amigdala, nucleo *accumbens*, ippocampo, corteccia entorinale.

Negli Invertebrati è stata riscontrata la presenza di PACAP-38 o di peptidi omologhi con azione modulatoria sui processi di apprendimento (Kandel & Abel, 1995).

A PACAP-38 sono riconosciuti anche effetti neuroprotettivi (Meyer, 2006) ed antiapoptotici (Dejda et al., 2005). I meccanismi d'azione attraverso cui PACAP-38 esplica i suoi molteplici effetti sono ancora oggetto di studio.

Ci è sembrato quindi interessante analizzare gli effetti ed i meccanismi d'azione di una somministrazione di PACAP-38 su un modello ben conosciuto come *H. medicinalis* che per la sua semplicità anatomica e per le sue caratteristiche fisiologiche bene, si presta ad indagare vari aspetti della funzionalità del sistema nervoso, sia a livello comportamentale che a livello cellulare.

In questo lavoro di tesi si è cercato:

- a) di valutare, partendo da osservazioni comportamentali, se la somministrazione di PACAP-38 modificasse la risposta a stimoli tattili nel paradigma comportamentale dell'induzione al nuoto;

- b) di individuare, nei neuroni sensoriali T, selettivamente attivati dagli stimoli somministrati nella procedura comportamentale, i meccanismi cellulari attivati da PACAP-38.

# MATERIALI E METODI

## Animali

Sono state utilizzate sanguisughe adulte (di circa 10 mesi), della specie *Hirudo medicinalis*, fornite dalla ditta francese Ricarimpex (Eisynes, Francia).

Gli animali sono stati stabulati in un termostato alla temperatura di 16°C all'interno di recipienti areati contenenti acqua oligominerale Panna (secondo le indicazioni inviateci dalla ditta fornitrice) e sottoposti al naturale ciclo luce-buio.

Gli animali prima di ogni operazione sono stati anestetizzati mediante immersione in soluzione di acqua di fonte ed etanolo al 10% per 15 min circa. Successivamente l'animale era fissato ventralmente sul fondo di una vaschetta di *plexiglass* rivestita di paraffina dove veniva mantenuto immerso in soluzione fisiologica.

## Soluzioni

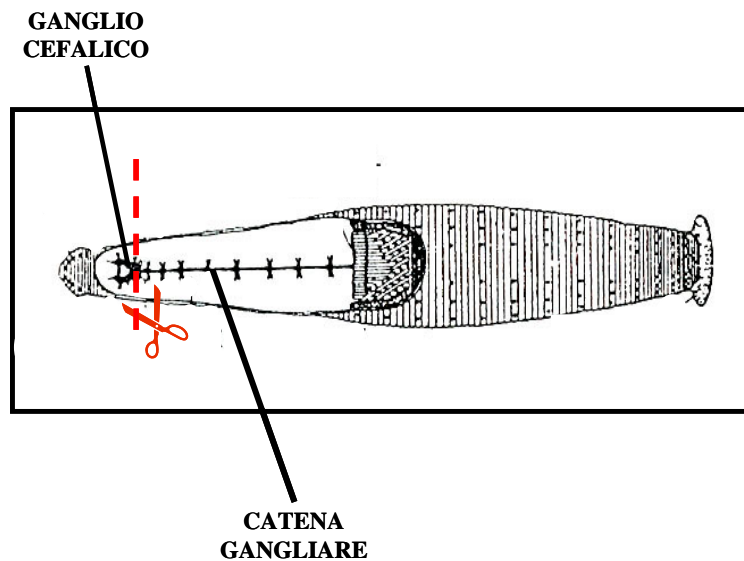
La composizione della soluzione fisiologica utilizzata è in mM: NaCl 115, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1,8, glucosio 10, tamponata a pH 7,4 con TRIS-maleato.

- PACAP-38 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- MDL12330A (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- LY83583 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- Apamina (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

sono stati disciolti in soluzione salina. LY83583, per problemi di solubilità, è stato disciolto in DMSO (dimetilsolfossido, solvente lipofilo) 1:1000 prima di essere aggiunto alla soluzione di perfusione. A tale diluizione, il DMSO non danneggia la membrana plasmatica e non modifica alcun parametro elettrofisiologico.

## Procedura comportamentale

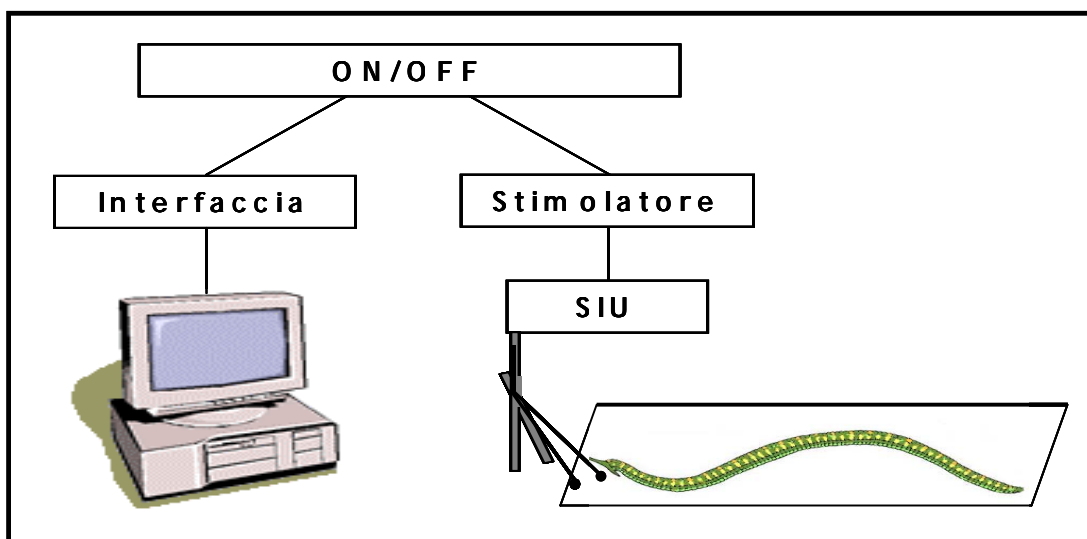
Il comportamento preso in esame è stato il nuoto evocato mediante applicazione di lievi stimoli elettrici alla cute. Due giorni prima della seduta di addestramento gli animali venivano sottoposti a disconnessione microchirurgica del ganglio cefalico dal primo ganglio segmentale (**Fig. 11**). Ciò ha lo scopo di eliminare l'inibizione tonica esercitata dalla massa cefalica sull'attività natatoria della sanguisuga (Brodfuehrer & Friesen, 1986b), in modo da ridurre la variabilità della risposta dell'animale all'applicazione di uno stimolo sensoriale. L'animale, quindi, in queste condizioni, risponde sempre con un ciclo di nuoto dopo stimolazione lieve elettrica della cute della porzione caudale. Al termine dell'intervento, la cute veniva suturata con filo di seta (Ethicon 6/0) e veniva introdotto un filo di cotone a livello della ventosa caudale, necessario per fissare, successivamente, l'animale all'apparato di registrazione.



**Fig. 11:** Disconnessione del ganglio cefalico dal primo segmentale.

Le sedute di addestramento sono state effettuate all'interno di un opportuno apparato di registrazione (**Fig. 12**): questo consiste in una vaschetta di *plexiglass* dotata di un supporto di paraffina, riempita con acqua Panna, nella quale l'animale era posto e mantenuto, tramite il filo di cotone inserito nella ventosa caudale e fissato alla paraffina. Un elettrodo bipolare di argento clorurato veniva posizionato al di sotto

della ventosa caudale; in questa condizione la sanguisuga poteva ricevere stimoli elettrici e, in risposta, nuotare senza allontanarsi dalla fonte dello stimolo. L'elettrodo bipolare era collegato ad una SIU (*Stimulus Isolation Unit*), che consentiva di scegliere l'intensità di stimolazione, e ad un generatore di impulsi, opportunamente interfacciato ad un computer, in modo che le caratteristiche dello stimolo fornito all'animale potessero essere variate tramite un *software* opportunamente costruito. Ciascuno stimolo consisteva di un treno di impulsi quadri ciascuno della durata di 5 ms alla frequenza di 8.3 Hz, per una durata complessiva del treno di 1.6 s (stimolo test).



**Fig. 12:** Apparato di registrazione. Spiegazione nel testo.

L'intensità di stimolazione utilizzata corrispondeva a quella ottenuta scegliendo il voltaggio minimo (variabile tra 0,8 V e 1,6 V) in grado di evocare un ciclo di nuoto. Tale voltaggio, una volta identificato per ogni animale, era mantenuto costante per tutta la sessione di addestramento. La stessa interfaccia seriale SR232 utilizzata per la stimolazione e il *software* (appositamente creato dalla ditta Numerica Progetti S.r.l. di Pisa), permettevano di misurare in tempo reale (mediante dispositivo ON/OFF) la latenza, in s, che intercorreva tra l'applicazione dello stimolo elettrico e l'inizio del ciclo di nuoto. La latenza è stata scelta come indice di responsività degli animali ed una sua variazione consente di evidenziare l'instaurarsi di processi di

apprendimento non associativo quali abitudine, sensitizzazione e disabitudine. Infatti, l'abitudine corrisponde ad un aumento della latenza con la quale gli animali rispondono agli stimoli test ripetuti con cadenza costante, mentre la sensitizzazione ad una riduzione della latenza alla presentazione dello stimolo test successivo ad uno stimolo nocicettivo. Per disabitudine si intende la riduzione della latenza in seguito a stimolo nocicettivo che si ha su una risposta precedentemente abituata.

Nei nostri esperimenti abbiamo valutato se iniezioni di differenti concentrazioni di PACAP-38 potessero modificare la latenza all'induzione al nuoto. La somministrazione di PACAP-38 è avvenuta mediante due iniezioni sul lato dorsale (ciascuna di 100 µl per g di peso dell'animale), una a livello cefalico e l'altra a livello caudale, nelle vicinanze del seno venoso, in modo che la distribuzione del farmaco risultasse più omogenea nel sistema nervoso.

## **Registrazione elettrofisiologica**

Registrazioni intracellulari sono state condotte da cellule T appartenenti a gangli segmentali isolati da animali *naïves*. L'estrazione della catena gangliare veniva effettuata, sotto microscopio binoculare, operando un'incisione degli strati muscolari e del seno venoso lungo la linea mediana del corpo e isolando ogni ganglio dopo averlo liberato dalla guaina di tessuto connettivo. L'operazione è stata eseguita a temperatura ambiente, mantenendo la sanguisuga immersa in soluzione fisiologica.

Si prelevavano i gangli segmentali dal 7° al 15°, evitando il quinto e il sesto poiché questi ultimi presentano una citoarchitettura meno stereotipata, in quanto contengono anche neuroni che innervano gli organi riproduttivi (Macagno, 1980) e quindi è più difficile riconoscere le cellule da utilizzare per le registrazioni.

Dopo almeno un'ora dal termine dell'operazione, tempo necessario affinché il preparato superi il trauma postoperatorio, i gangli venivano fissati singolarmente sul fondo di una camera di registrazione rivestita di resina trasparente *Sylgard* (Dow Corning, Midland, MI, USA). Per la registrazione elettrofisiologica, la cameretta veniva posta sotto un microscopio in campo scuro.

Durante la registrazione, il preparato era perfuso costantemente e in modo omogeneo, per mezzo di una pompa peristaltica (1 cc/min) (Masterflex, Cole-Parmer

Instrument Co., Chicago, Illinois), con la stessa soluzione fisiologica con cui veniva condotta la dissezione.

La tecnica di registrazione utilizzata è stata il *current clamp* convenzionale.

Osservando al microscopio in campo scuro un ganglio segmentale, posto con il lato ventrale rivolto verso l'alto, è stato possibile riconoscere i neuroni T per forma e posizione (Baylor & Nicholls, 1969a). Le cellule T venivano penetrate con micropipette di borosilicato (diametro esterno 1,5 mm; diametro interno 0,8 mm) ricavate da capillari disponibili in commercio (Hilgerberg GmbH, Germany) e opportunamente forgiate con un *puller* a controllo computerizzato (Brown Flaming P-97, Sutter Instruments, USA). Le micropipette, riempite con una soluzione di potassio acetato ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) 4 M tamponato a pH 7,4, costituivano il supporto meccanico del microelettrodo rappresentato da un filo di argento clorurato. Sono state utilizzate micropipette che, una volta riempite, mostravano una resistenza variabile tra 80 e 120 M $\Omega$ . L' elettrodo di riferimento che chiudeva il circuito nel bagno di perfusione era un *pellet* di argento clorurato.

I segnali in voltaggio sono stati rilevati da un amplificatore Axoclamp 2B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) e filtrati ad una frequenza di 30 kHz. Poi tramite un'interfaccia BNC-2090 (National Instruments S.r.l., Milano, Italia) collegata ad un sistema di acquisizione e stimolazione (LabView, National Instruments, Austin, Texas, USA) i segnali venivano digitalizzati e campionati alla frequenza di 10 kHz. In questo modo, è possibile stimolare e registrare contemporaneamente con un solo elettrodo ed acquisire in tempo reale le risposte immagazzinandole su un computer al fine di essere analizzate successivamente.

Durante le registrazioni abbiamo valutato i seguenti parametri elettrofisiologici: il potenziale di membrana a riposo ( $V_m$ ), la resistenza di ingresso ( $R_m$ ) e l'ampiezza della AHP.

La AHP è stata indotta iniettando treni di impulsi depolarizzanti (durata 200 ms; frequenza 2,5 Hz) per un tempo complessivo di 3 s. Poiché l'ampiezza della AHP dipende dal numero di potenziali d'azione, la frequenza di scarica è stata mantenuta costante durante ogni singola registrazione regolando la quantità di corrente iniettata (compresa tra 0,4 e 0,8 nA). È stata scelta l'intensità di corrente in grado di far

sorgere, nella cellula T, 7-8 potenziali d'azione per ogni impulso di 200 ms che corrispondono al numero di *spikes* indotti dalla stimolazione tattile della cute dell'animale (Scuri et al., 2002); inoltre durante le varie fasi sperimentali,  $V_m$  e  $R_m$  (misurata iniettando impulsi iperpolarizzanti della durata di 200 ms e 0,5 nA di intensità) sono stati costantemente monitorati e sono stati studiati solo quei neuroni con  $R_m > 50 \text{ M}\Omega$  e  $V_m$  a riposo di almeno -40 mV.

## **Analisi dei dati**

I dati sono stati espressi come medie  $\pm$  E.S.

Negli esperimenti di comportamento per ogni animale è stata misurata la risposta basale (latenza media,  $L_m$ ), come media delle latenze registrate dopo 4 stimoli test applicati ad intervalli di tempo *random* (secondo tabelle costruite su un intervallo compreso tra 30 s e 2 min), in modo da non indurre abitudine, e la latenza a 10, 20 e 30 min dall'iniezione di PACAP-38.

La significatività statistica è stata valutata mediante test ANOVA per misure ripetute e *Dunnet post-hoc test* per evidenziare le differenze significative tra i risultati ottenuti in controllo e quelli ottenuti nelle varie fasi sperimentali. Il Mann Whitney-U-test è stato utilizzato per analizzare l'entità della sensitizzazione indotta da diverse concentrazioni di neuropeptide, comparando la differenza tra latenza media e la latenza dopo 10 min dall'iniezione ( $L_m - L_{10'}$ ) con il valore 0, considerato come differenza nulla.

Nelle registrazioni elettrofisiologiche i valori di  $V_m$ ,  $R_m$  e di ampiezza della AHP venivano misurati in ogni singola fase dell'esperimento. Le ampiezze delle singole AHP sono state misurate a partire dalla linea di base, che rappresenta il  $V_m$  di riposo, fino al picco della deflessione.

Con il test statistico ANOVA per misure ripetute e *Dunnet post-hoc test* sono stati confrontati i risultati ottenuti nelle diverse fasi sperimentali con quelli ottenuti nel controllo.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il *software GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) e la significatività statistica è stata posta a  $p < 0,05$ .



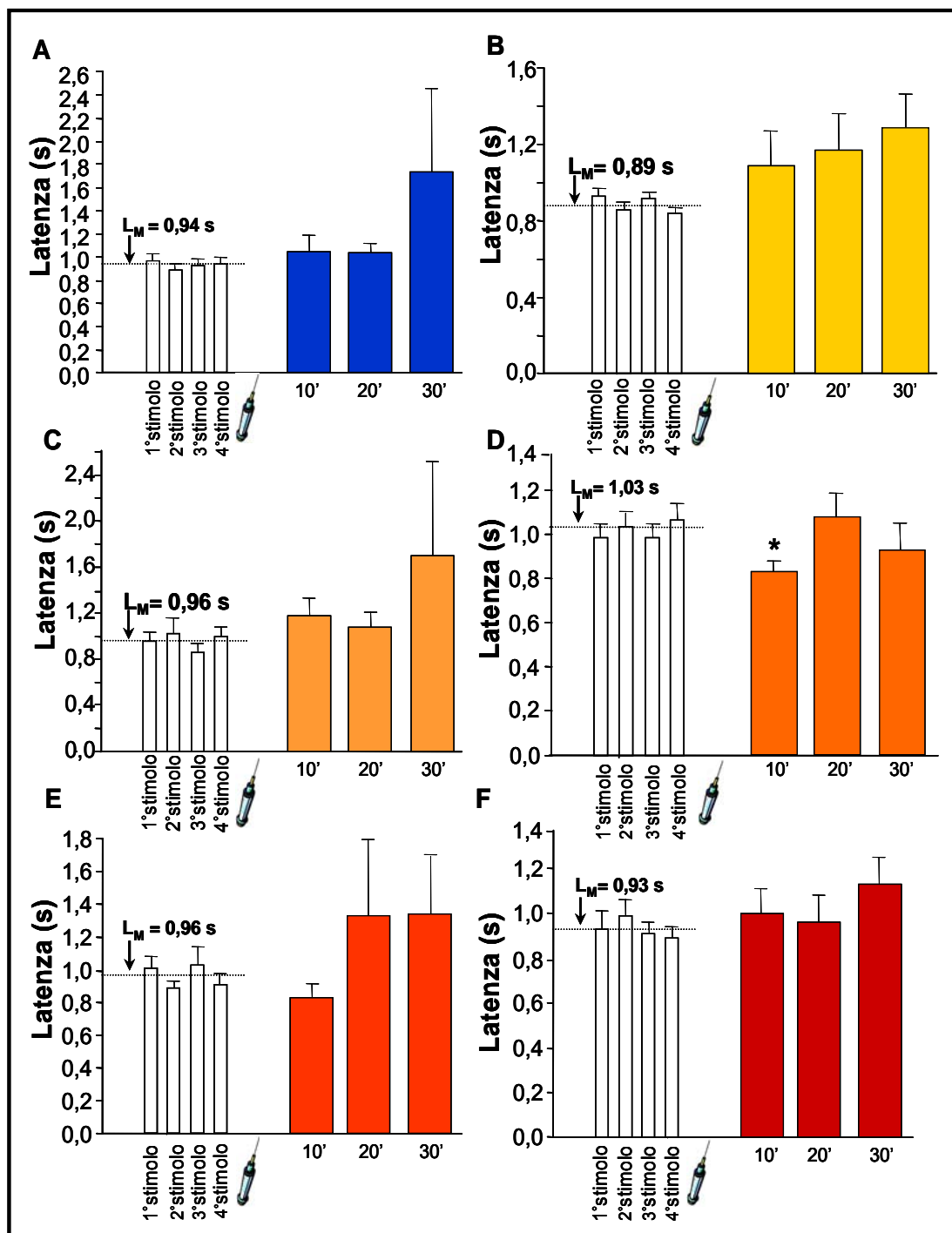
## RISULTATI


### Effetti della somministrazione di PACAP-38 nell'induzione al nuoto

Per mettere in evidenza un eventuale effetto modulatorio di PACAP-38 sulla risposta allo stimolo test nell'induzione al nuoto nella sanguisuga (vedi Materiali e Metodi), abbiamo condotto esperimenti in cui, in ogni animale, dopo avere misurato il valore della latenza media ( $L_m$ , vedi Materiali e Metodi), che rappresenta la risposta basale, era iniettato PACAP-38 e quindi misurate le latenze di risposta allo stimolo test dopo 10, 20 e 30 min dall'iniezione. Sono state utilizzate varie concentrazioni di PACAP-38: **0,01 nM** (n=17 animali), **0,05 nM** (n=9 animali), **0,1 nM** (n=12 animali), **0,5 nM** (n=11 animali), **1 nM** (n=13 animali). Un gruppo di animali di controllo (n = 19 animali) è stato iniettato con soluzione fisiologica.

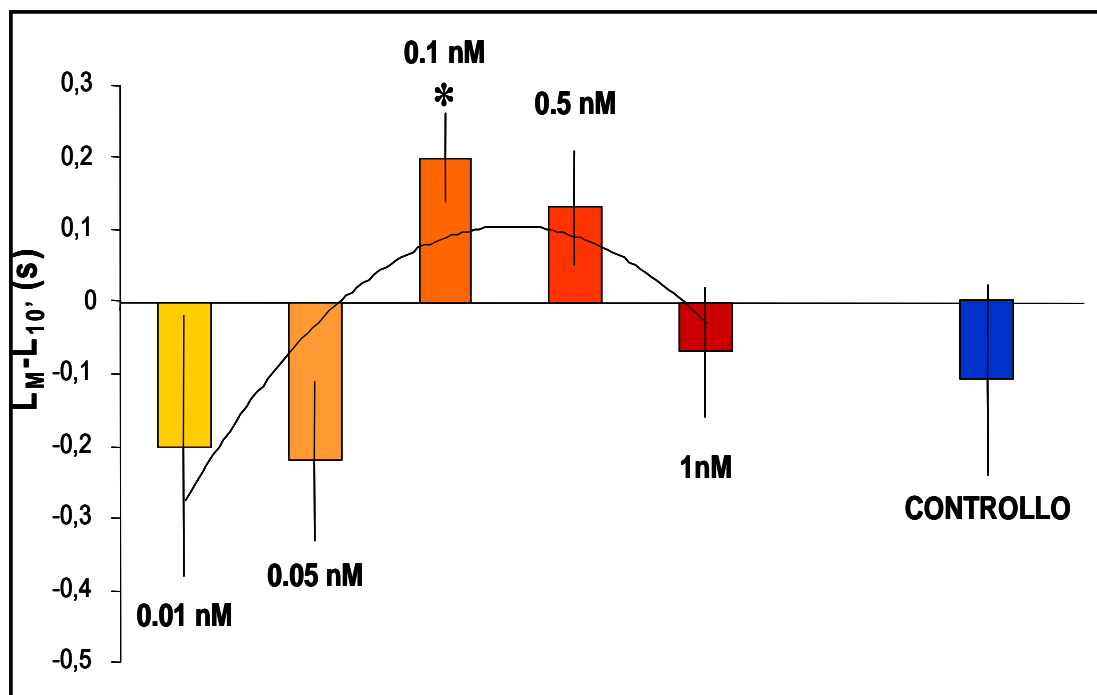
In **Fig. 13** sono riportati gli istogrammi che mostrano i valori medi + E.S. delle latenze, misurate in s, nelle diverse fasi sperimentali nei sei gruppi di animali analizzati.

Per tutti e sei i gruppi sperimentali, sono stati confrontati i valori medi delle latenze mediante analisi della varianza. Il test ANOVA per misure ripetute ha mostrato differenze significative tra le latenze solo negli animali trattati con PACAP-38 0,1 nM ( $F_{3,11}=1,466$ ;  $p=0,015$ ) e il *post-hoc test* di Dunnet ha evidenziato che la latenza misurata a 10 min ( $L_{10'}$ ) dall'iniezione di PACAP-38 è significativamente ridotta rispetto a  $L_m$  ( $p<0,05$ ). Questi dati indicano che PACAP-38 0,1 nM ha effetto sensitizzante nell'induzione al nuoto.



**Fig. 13:** Effetti di PACAP-38 sull'induzione al nuoto. In ogni istogramma in ordinate sono riportate le latenze in secondi e in ascisse le varie fasi sperimentali. Le prime 4 colonne in ogni istogramma rappresentano le risposte agli stimoli test applicati ad intervalli random utilizzate per calcolare  $L_M$  (linea tratteggiata).  iniezione di PACAP-38 o soluzione fisiologica. Le restanti colonne indicano le risposte allo stimolo test registrate dopo 10 (10'), 20 (20') e 30 (30') min dall'iniezione. **A:** gruppo di controllo iniettato con soluzione fisiologica. **B:** gruppo iniettato con PACAP-38 0,01 nM. **C:** gruppo iniettato con PACAP-38 0,05 nM. **D:** gruppo iniettato con PACAP-38 0,1 nM. **E:** gruppo iniettato con PACAP-38 0,5 nM. **F:** gruppo iniettato con PACAP-38 1 nM. \*  $p < 0,05$  (ANOVA per misure ripetute e Dunnet *post-hoc* test).

Per sensitizzazione si intende un incremento della risposta ad uno stimolo test in seguito ad un evento generalmente nocicettivo. Nei nostri esperimenti l'incremento della risposta è rappresentato da una riduzione della latenza rispetto a  $L_m$ . Nel grafico di **Fig. 14** sono riportate le differenze  $L_m - L_{10'}$ , misurate negli animali trattati con le varie concentrazioni di PACAP-38 e con soluzione fisiologica. Il test di Mann Whitney utilizzato per confrontare all'interno di ogni gruppo  $L_m - L_{10'}$  vs 0 (che rappresenta nessuna differenza) ha evidenziato che, alla sola concentrazione di PACAP-38 0,1 nM, la differenza positiva misurata è risultata significativa ( $p=0,0387$ ). Per le concentrazioni 0,01 nM e 0,05 nM e 1 nM si osserva un aumento di  $L_{10'}$  (differenza negativa), come nel gruppo di controllo che però non raggiunge la significatività statistica; mentre, per PACAP-38 0,5 nM si osserva una riduzione di  $L_{10'}$  (nuovamente differenza positiva) che non risulta statisticamente significativa. La curva di *fitting* costruita sui dati ottenuti descrive una curva a campana degli effetti di PACAP-38.



**Fig. 14:** Effetto delle varie concentrazioni di PACAP-38 sull'induzione al nuoto. In ordinate sono riportate le differenze di latenza, in s, e in ascisse i vari trattamenti. Il gruppo trattato con soluzione fisiologica è il gruppo di controllo. Si nota l'effetto a campana di PACAP-38. \*  $p < 0,05$  (Mann Whitney-U-test)

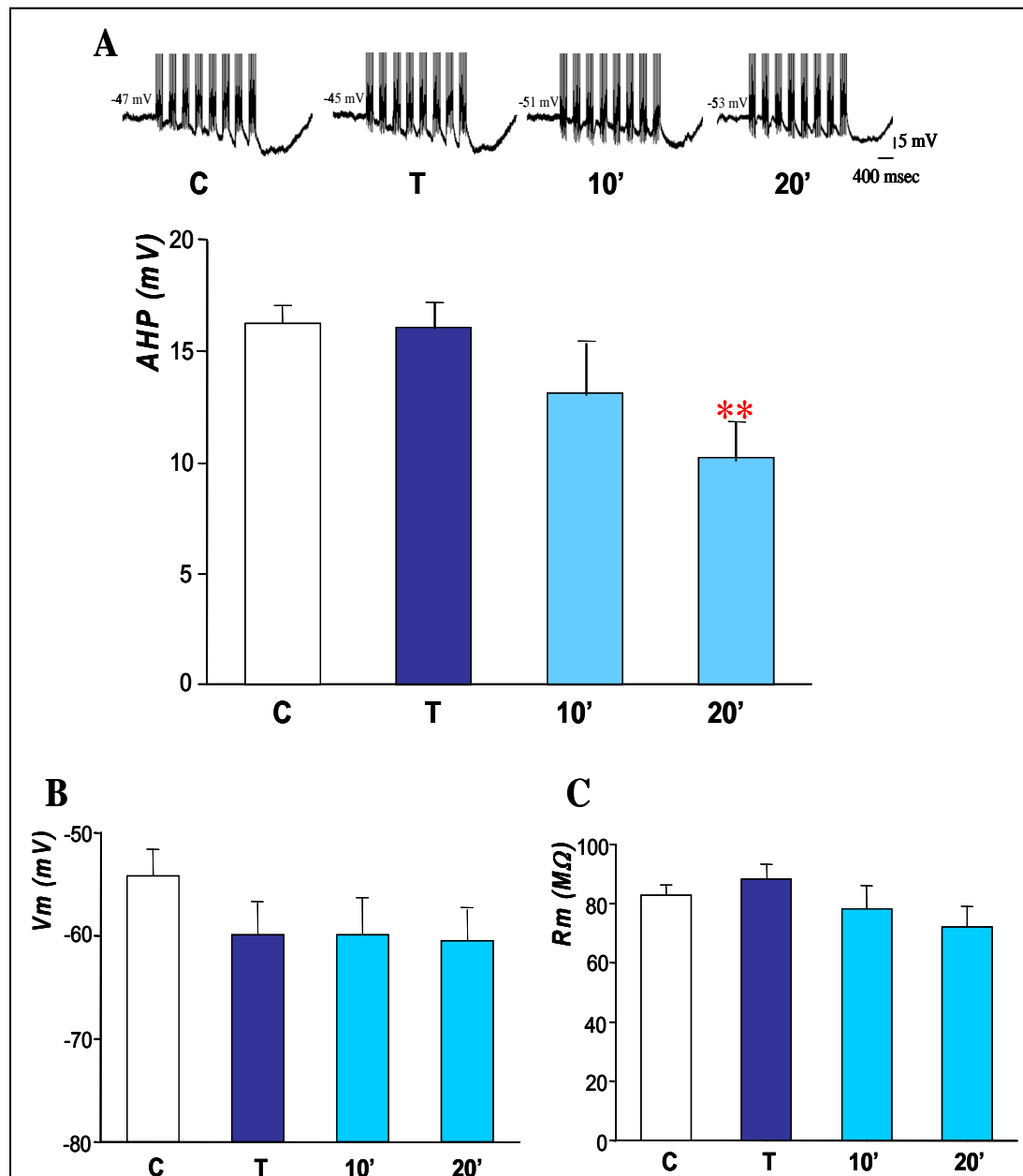
## Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM sui parametri elettrofisiologici delle cellule T

Le osservazioni fatte a livello comportamentale indicano che PACAP-38 ha effetto sensitizzante alla concentrazione di 0,1 nM. Al fine di comprendere come questo effetto si espliciti a livello cellulare, sono state condotte registrazioni elettrofisiologiche dai neuroni sensoriali T, che sono selettivamente attivate dagli stimoli test utilizzati per indurre il nuoto (Scuri et al., 2007) negli esperimenti comportamentali e che svolgono un ruolo chiave nell'integrazione sensoriale alla base della sensitizzazione.

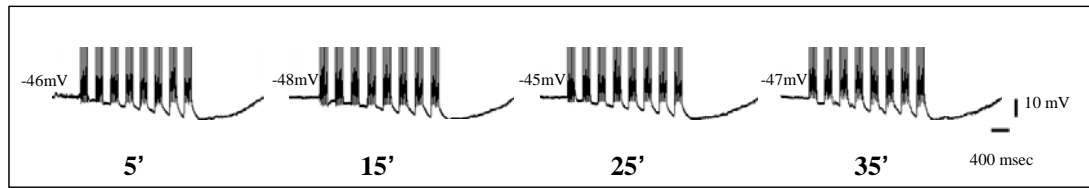
Gangli isolati da animali *naïves* sono stati perfusi per 5 min con PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM e Vm, Rm e ampiezza della AHP sono stati registrati da singole cellule T (n=8) in soluzione fisiologica, prima dell'applicazione di PACAP-38 (controllo, C), subito dopo il trattamento con il neuropeptide (T) e durante il lavaggio in soluzione fisiologica. La scelta della concentrazione di PACAP-38 utilizzata è stata suggerita dalla consultazione di dati riportati in letteratura, ma anche dal fatto che essa è risultata essere la massima possibile per condurre le registrazioni in modo che le cellule si mantenessero in buone condizioni per il tempo richiesto dal protocollo sperimentale.

In **Fig. 15A** sono riportati i valori medi + E.S., in mV, dell'ampiezza della AHP registrata nelle diverse fasi sperimentali. Il test statistico ANOVA per misure ripetute ( $F_{3,7}=7,477$ ;  $p=0,0014$ ) e il Dunnet *post-hoc test* hanno messo in evidenza una riduzione significativa dell'ampiezza della AHP misurata a 20 min (20') di lavaggio con soluzione fisiologica rispetto al controllo (C;  $p < 0,001$ ). Come mostrato in figura 15B e 15C non sono state registrate variazioni significative del Vm ( $F_{3,7}=2,515$ ,  $p=0,0861$ ) e Rm ( $F_{3,7}=1,831$ ,  $p=0,1725$ ) rispettivamente durante le varie fasi sperimentali.

Registrazioni di controllo effettuate ogni 5 min da cellule T (n=8) perfuse con soluzione fisiologica per almeno 25 min non hanno evidenziato variazioni dell'ampiezza della AHP (**Fig. 16**) così come di Rm (dati non mostrati) per tutto il tempo della registrazione.



**Fig. 15:** Effetti di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM sui parametri elettrofisiologici delle cellule T. In questa figura e in quelle successive sono stati graficati gli effetti di PACAP-38 su AHP (**A**), Vm (**B**) e Rm (**C**). Gli istogrammi riportano in ordinate i valori dei parametri registrati nelle varie fasi sperimentali indicate in ascisse con C (controllo in soluzione fisiologica), T (dopo 5 min di perfusione con PACAP-38) 10' e 20' (rispettivamente 10 e 20 min di lavaggio in soluzione fisiologica). **A:** L'ampiezza della AHP risulta ridotta significativamente rispetto al controllo a 20 min di lavaggio. Le tracce superiori mostrano le registrazioni ottenute da una singola cellula. **B:** Il voltaggio di membrana (Vm) non varia significativamente né subito dopo il trattamento né durante il lavaggio in soluzione fisiologica così come la resistenza d'ingresso (Rm) mostrata in **C**. \*\*  $p < 0,001$ .



**Fig. 16:** Andamento dell'ampiezza della AHP durante perfusione prolungata con soluzione fisiologica. Tracce registrate da singola cellula. Si noti come l'ampiezza della AHP non vari durante la perfusione con soluzione fisiologica.

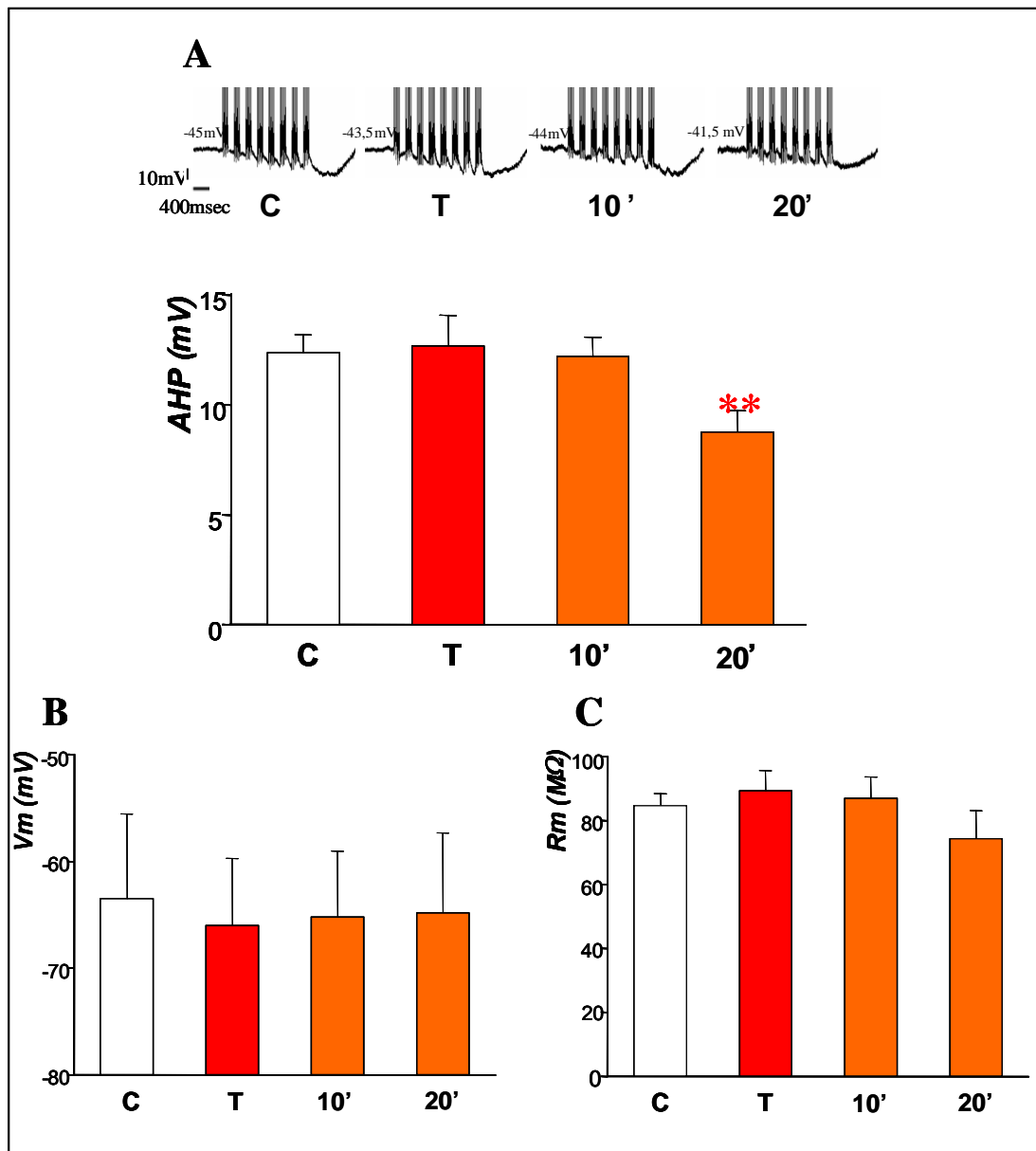
## Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM sulle cellule T in presenza di apamina 1 nM

I risultati ottenuti hanno mostrato che PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM modula la AHP nei neuroni T determinandone la riduzione dell'ampiezza. La AHP nei neuroni T è dovuta, prevalentemente, all'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e per un 25% all'attivazione di una conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente. Allo scopo di analizzare su quale di queste due componenti agisca PACAP-38, è stata condotta una seconda serie di registrazioni in presenza del bloccante della conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente, apamina. Sono stati misurati  $V_m$ ,  $R_m$  e ampiezza della AHP in cellule T ( $n=6$ ) di gangli estratti da animali *naïves* e preincubati per 15 min con apamina 1 nM (Scuri et al., 2002) (C), quindi trattati con PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM (T) per 5 min ed infine, sottoposti a lavaggio in apamina.

La **Fig. 17A** mostra i valori medi + E.S. in mV dell'ampiezza della AHP registrata nelle diverse fasi sperimentali. Il test statistico ANOVA per misure ripetute ( $F_{3,5}=6,214$ ;  $p=0,0059$ ) e il Dunnet *post-hoc test* hanno messo in evidenza che l'ampiezza della AHP misurata a 20 min (20') di lavaggio risulta essere significamene ridotta rispetto al controllo (C;  $p<0,001$ ) così come avviene dopo trattamento con solo PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM. Le **Fig. 17B** e **17C** mostrano i valori di  $V_m$  e  $R_m$  rispettivamente. Anche in questo caso, non sono state registrate variazioni significative sia di  $V_m$  (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,5}=0,347$ ;  $p=0,7926$ ), sia di  $R_m$  (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,5}=2,031$ ;  $p=0,1528$ ) durante le varie fasi sperimentali.

Questi risultati suggeriscono che, PACAP-38 riduce l'ampiezza della AHP agendo sull'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi. Infatti, tale riduzione non può essere imputata all'applicazione di apamina. Come riportato in Mozzachiodi et al. (2001), l'ulteriore prolungata perfusione (oltre i 15 min di preincubazione) con solo apamina non determina ulteriori modificazioni dei parametri elettrofisiologici rispetto ad un controllo in fisiologica oltre l'iniziale riduzione di circa il 25% dell'ampiezza della AHP.





**Fig. 17:** Effetti di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM sulle cellule T in presenza di apamina 1 nM. A: Si noti la significativa riduzione dell'ampiezza della AHP rispetto al controllo a 20 min di lavaggio (20') anche in presenza di apamina 1 nM. Le tracce superiori mostrano le registrazioni ottenute da una singola cellula. B: Il voltaggio di membrana ( $V_m$ ) non varia significativamente durante i vari trattamenti. C: la resistenza d'ingresso ( $R_m$ ) rimane invariata nelle varie fasi sperimentali. \*\* $p < 0,001$ .

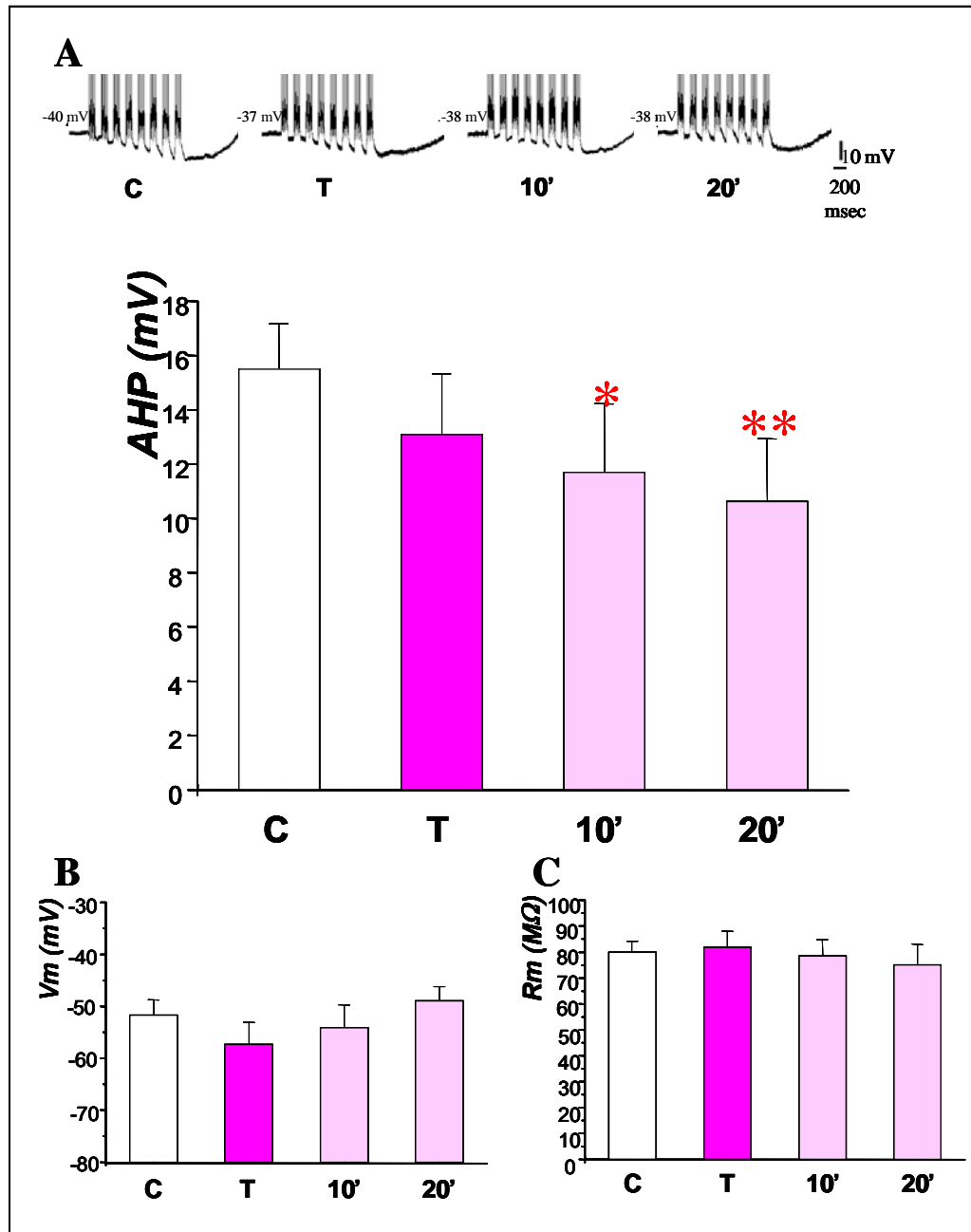
### Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM in presenza di LY83583 0,1 $\mu$ M

Come osservato negli esperimenti precedentemente descritti, l'effetto di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM sull'ampiezza della AHP si manifesta a 20 min di lavaggio. Ciò suggerisce che il neuropeptide agisca attivando vie intracellulari di trasduzione del segnale che coinvolgono secondi messaggeri. Allo scopo di individuare queste vie di trasduzione, in una prima fase, sono state condotte registrazioni da cellule T (n=7) in gangli estratti da animali *naïves* in presenza dell'inibitore della guanilato ciclasi LY 83583. I gangli sono stati preincubati con LY 83583 0,1  $\mu$ M per 15 min (controllo, C), perfusi per 5 min con PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM (T) e quindi lavati in soluzione fisiologica contenente LY 83583 0,1  $\mu$ M.

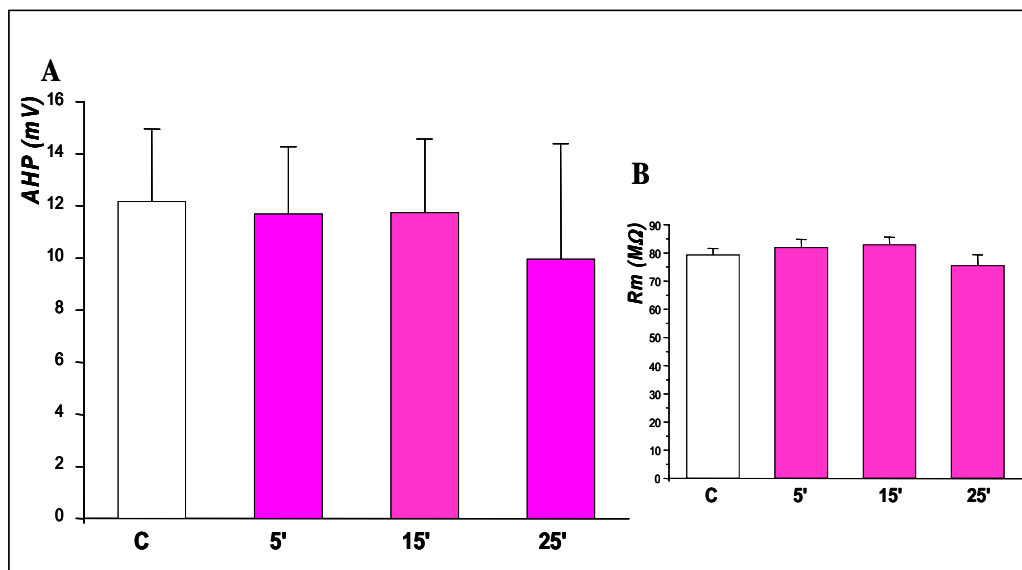
La **Fig. 18A** mostra i valori medi + E.S., in mV, dell'ampiezza della AHP registrata nelle cellule T nelle diverse fasi sperimentali. Il test statistico ANOVA per misure ripetute ( $F_{3,6}=7,474$ ;  $p=0,0019$ ) e il Dunnet *post-hoc test* hanno messo in evidenza che l'ampiezza della AHP misurata sia a 10 (10') sia a 20 (20') min di lavaggio risulta essere significativamente ridotta rispetto al controllo (C;  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  rispettivamente). La **Fig. 18B** mostra i valori di  $V_m$ . Anche in questo caso, non sono state registrate variazioni significative (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,6}=3,382$ ;  $p=0,041$ , Dunnet *post-hoc test*,  $p > 0,05$ ) tra il valore di controllo e i valori registrati nelle altre fasi sperimentali, mentre il Tukey *post-hoc test* ha evidenziato una differenza significativa tra il valore registrato dopo applicazione di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM (T) e il valore registrato a 20 min di lavaggio (20'). La **Fig. 18C** mostra i valori di  $R_m$  che non variano (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,6}=0,7987$ ;  $p=0,5106$ ) durante le varie fasi sperimentali.

Questi risultati indicano che il blocco della sintesi di guanosin monofosfato ciclico (cGMP) non interferisce con l'azione di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM.

Registrazioni di controllo effettuate ogni 5 min da cellule T (n=7) trattate con il solo LY83583 0,1  $\mu$ M per almeno 25 min non hanno evidenziato variazioni dell'ampiezza della AHP così come di  $R_m$  per tutto il tempo del trattamento (**Fig. 19**).



**Fig. 18:** Effetti di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM sui neuroni T in presenza di LY 83583 0,1  $\mu$ M. **A:** Si noti la significativa riduzione dell'ampiezza della AHP rispetto al controllo sia a 10 (10') sia a 20 (20') min di lavaggio in presenza di LY 83583 0,1  $\mu$ M. Le tracce superiori mostrano le registrazioni ottenute da una singola cellula. **B:** Vm non varia significativamente durante le varie fasi sperimentali rispetto al controllo (C). **C:** Anche Rm non varia durante le varie fasi sperimentali, rispetto al controllo.\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .



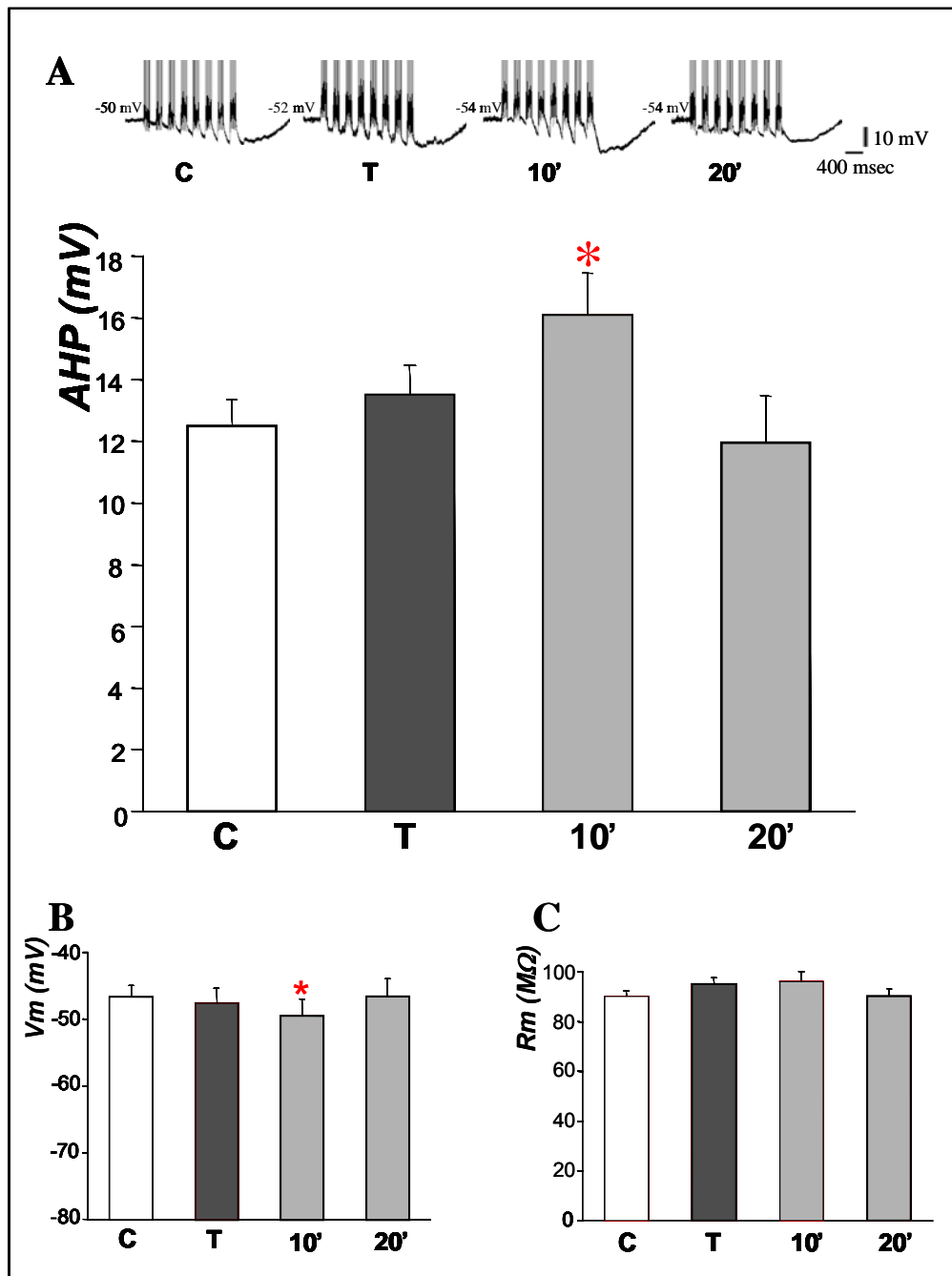
**Fig. 19:** Effetti di LY83583 0,1  $\mu\text{M}$  sulle cellule T. **A:** L'istogramma mostra l'ampiezza della AHP registrata in controllo (prima del trattamento, C), e ogni 5 min durante la perfusione con LY 83583 0,1  $\mu\text{M}$ . Non si evidenziano variazioni (ANOVA per misure ripetute,  $F_{4,6}=1,69$ ,  $p=0,1675$ ). **B:** L'istogramma mostra i valori di  $R_m$  registrata in controllo (prima del trattamento, C), e ogni 5 min durante la perfusione con LY83583 0,1  $\mu\text{M}$ . Anche per  $R_m$  non si osservano variazioni significative (ANOVA per misure ripetute,  $F_{4,6}=1,205$ ,  $p=0,3306$ ).

### **Effetti di PACAP-38 $5 \cdot 10^{-3}$ nM in presenza di MDL12330A 1 $\mu$ M**

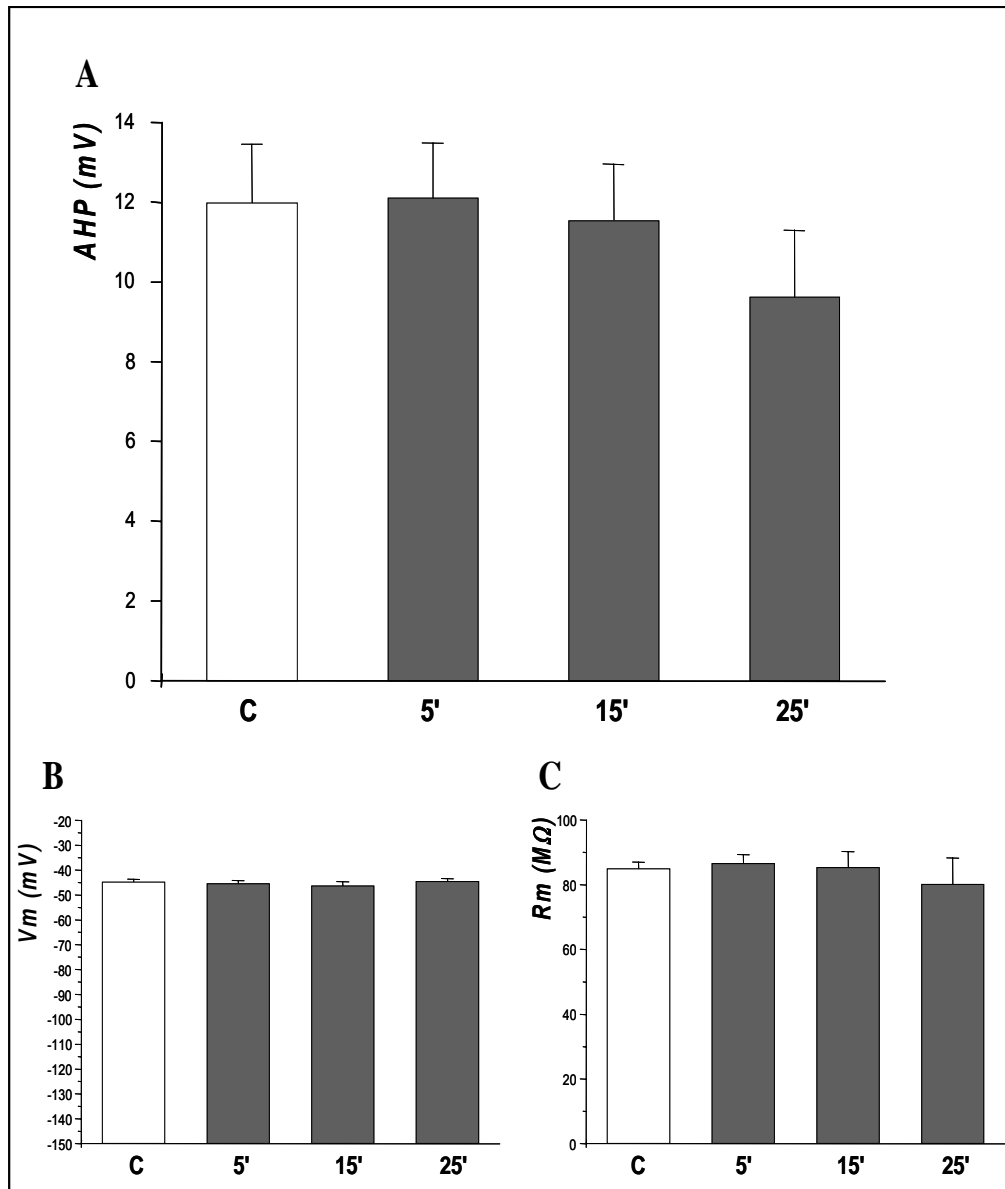
Dal momento che la via del cGMP non sembra coinvolta negli effetti del PACAP-38 sulle cellule T, è stato analizzato il coinvolgimento della via del cAMP. È noto che i recettori di PACAP-38 possono essere accoppiati all'attivazione dell'adenilato ciclasi. Sono state pertanto eseguite registrazioni elettrofisiologiche in cellule T (n=9) di gangli isolati da animali *naïves* e trattati con l'inibitore dell'adenilato ciclasi MDL12330A 1  $\mu$ M (Catarsi et al., 1993). I gangli sono stati preincubati con MDL12330A 1  $\mu$ M per 10 min (controllo, C), perfusi per 5 min con PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM (T) e quindi lavati in soluzione fisiologica contenente MDL 12330A 1  $\mu$ M.

La **Fig. 20A** mostra i valori medi + E.S., in mV, dell'ampiezza della AHP registrata nelle cellule T nelle varie fasi sperimentali. Si osserva che l'ampiezza della AHP tende ad aumentare e risulta significativamente maggiore rispetto al controllo a 10 min di lavaggio (10') (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,8}=3,851$ ;  $p=0,0221$ ; Dunnet *post-hoc test*,  $p<0,05$ ). La **Fig. 20B** mostra i valori di  $V_m$ . Si osserva a 10 min di lavaggio (10') una iperpolarizzazione del voltaggio di membrana rispetto al controllo statisticamente significativo (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,8}= 3,058$ ;  $p=0,047$ ; Dunnet *post hoc test*,  $p<0,05$ ). La **Fig. 20C** mostra, infine, l'andamento di  $R_m$ , che risulta significativamente maggiore rispetto al controllo a 10 min di lavaggio (10') (ANOVA per misure ripetute,  $F_{3,8}=6,029$ ,  $p=0,0033$ ; Dunnet *post-hoc test*,  $p<0,05$ ). Questi risultati dimostrano che la riduzione della sintesi di cAMP non solo blocca gli effetti di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM, ma determina effetti opposti.

Registrazioni di controllo effettuate ogni 5 min da cellule T (n=7) trattate con il solo MDL12330A 1  $\mu$ M per almeno 30 min non hanno evidenziato variazioni dell'ampiezza della AHP così come di  $R_m$  e  $V_m$  per tutto il tempo del trattamento (**Fig. 21**).



**Fig. 20:** Effetti di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM sui neuroni T in presenza di MDL12330A  $1 \mu\text{M}$ . **A:** L'inibizione della AC produce un significativo aumento dell'ampiezza della AHP rispetto al controllo a 10 (10') min di lavaggio con MDL12330A  $1 \mu\text{M}$  dopo applicazione di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM. Le tracce superiori mostrano le registrazioni ottenute da una singola cellula. **B:** In presenza di MDL12330A  $1 \mu\text{M}$  il  $V_m$  varia significativamente: in particolare, a 10 (10') min di lavaggio con MDL12330A  $1 \mu\text{M}$  dopo applicazione di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM risulta essere iperpolarizzato rispetto al controllo (C). **C:** Anche  $R_m$  varia significativamente: a 10 (10') min di lavaggio con MDL12330A  $1 \mu\text{M}$  dopo applicazione di PACAP-38  $5 \cdot 10^{-3}$  nM. Risulta esser maggiore rispetto al controllo. \*  $p < 0,05$ .



**Fig. 21:** Effetti di MDL12330A 1  $\mu$ M sulle cellule T. **A:** L'istogramma mostra l'ampiezza della AHP registrata in controllo (prima del trattamento, C), e ogni 5 min durante la perfusione con MDL12330A 1  $\mu$ M. Non si evidenziano variazioni significative (ANOVA per misure ripetute,  $F_{6,3}=0,54$ ,  $p=0,7711$ ). **B:** L'istogramma descrive l'andamento del Vm in controllo (prima del trattamento, C), e ogni 5 min durante la perfusione con MDL12330A 1  $\mu$ M mostrando che non si ha alcuna variazione (ANOVA per misure ripetute,  $F_{6,3}=1,0054$ ,  $p=0,4523$ ). **C:** L'istogramma riporta i valori di Rm registrati in controllo (prima del trattamento, C), e ogni 5 min durante la perfusione con MDL12330A 1  $\mu$ M. Anche in questo caso, non si osservano variazioni significative (ANOVA per misure ripetute,  $F_{6,3}=0,3939$ ;  $p=0,8733$ ).

## Discussione

In questo lavoro di Tesi abbiamo analizzato gli effetti del neuropeptide PACAP-38 in forme di plasticità sinaptica utilizzando un modello sperimentale ben conosciuto quale la sanguisuga *H. medicinalis*.

Il nostro studio è partito da osservazioni del comportamento degli animali per valutare se la somministrazione di PACAP-38 potesse modificare la risposta dell'animale a lievi stimoli tattili nell'induzione al nuoto.

I dati ottenuti mostrano che l'iniezione di PACAP-38, alla concentrazione di 0,1 nM, determina un significativo effetto sensitizzante. Gli animali, dopo 10 min dal trattamento, rispondono allo stimolo test in maniera più repentina, rispetto alla loro risposta basale, misurata prima dell'iniezione. Infatti, la latenza misurata dopo trattamento con PACAP-38 0,1 nM è risultata minore in modo statisticamente significativo rispetto alla latenza media. Sebbene alle altre concentrazioni utilizzate non si riscontrino variazioni statisticamente significative tra  $L_{10'}$  e  $L_m$  si può osservare una tendenza alla riduzione di  $L_{10'}$  dopo iniezione di soluzione di PACAP-38 0,5 nM, e a concentrazioni più basse e più alte, 0,01 nM, 0,05 nM e 1 nM rispettivamente, un incremento dei valori medi di  $L_{10'}$ .

Il fatto che l'azione di PACAP-38 sia legata alla dose sembra essere in linea con i risultati ottenuti sul ratto presenti in letteratura. Ad esempio, Sacchetti e collaboratori, nel 2001, hanno dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare nel cervello di ratto di PACAP-38 alla concentrazione di 0,2 ng/10 $\mu$ L induce miglioramenti nella ritenzione mnemonica: infatti, ratti sottoposti ad un paradigma di apprendimento associativo, mostrano miglioramenti nell'acquisizione mnemonica dopo il trattamento con il neuropeptide, che non risulta invece agire né a concentrazioni superiori né a concentrazioni inferiori.

Il coinvolgimento di PACAP-38 nell'instaurarsi di forme di apprendimento e memoria è emerso da numerose evidenze sperimentali. In *Drosophila*, per esempio, la mancanza del peptide PACAP-simile (Feany & Quinn, 1995; Davis, 1990) determina *deficit* nell'apprendimento associativo olfattivo. La mutazione del gene



*amn* influenza la ritenzione mnemonica nel moscerino della frutta, allo stesso modo, topi mancanti del gene che codifica per il recettore di PACAP-38, mostrano un *deficit* nell'instaurarsi della LTP e nell'apprendimento associativo dipendente dall'ippocampo (Hashimoto et al., 2002).

Dalle osservazioni comportamentali, PACAP-38, in *H. medicinalis*, sembra essere coinvolto nella modulazione dell'attività natatoria indotta da stimoli tattili.

Il paradigma comportamentale dell'induzione al nuoto da noi utilizzato consiste nell'applicare una lieve stimolazione elettrica alla cute dell'animale per indurre un atto di nuoto. Misurando la latenza e valutandone le variazioni durante le sessioni di addestramento è possibile misurare variazioni del comportamento dell'animale che in passato hanno consentito di valutare anche l'instaurarsi di processi di apprendimento (Zaccardi et al., 2001). Ad esempio, la riduzione significativa della latenza che fa seguito ad un particolare trattamento, è indice dell'instaurarsi di sensitizzazione.

Studi condotti in precedenza hanno evidenziato che la sensitizzazione può essere prodotta nell'induzione al nuoto mediante l'applicazione di stimoli nocicettivi e l'effetto sensitizzante prodotto è 5HT- e cAMP-dipendente (Zaccardi et al., 2004).

L'effetto sensitizzante da noi osservato a livello comportamentale in seguito a trattamento con PACAP-38 da cosa può dipendere?

La stimolazione elettrica della cute (stimolo test) che induce l'atto natatorio, attiva selettivamente i neuroni tattili T, la cui scarica elettrica è caratterizzata dalla AHP.

La modulazione dell'ampiezza della AHP può essere considerata un meccanismo di plasticità sinaptica legato all'attività cellulare. Questo è stato dimostrato andando ad analizzare l'entità della connessione sinaptica tra una cellula T e un neurone *follower*. È stato visto che ad una riduzione dell'ampiezza della AHP nell'elemento presinaptico corrisponde un incremento dell'ampiezza del potenziale postsinaptico (Scuri et al., 2007), mentre ad un incremento dell'ampiezza della AHP fa seguito una riduzione dell'ampiezza del potenziale postsinaptico (Scuri et al., 2002).

Per analizzare gli effetti cellulari di PACAP-38 in *H. medicinalis* abbiamo spostato l'indagine a livello delle cellule sensoriali T. Dall'indagine elettrofisiologica da noi condotta su queste cellule emerge che l'effetto di PACAP-38 è quello di modulare l'ampiezza della AHP negativamente: dopo 20 min dall'applicazione del

neuropeptide nel bagno di perfusione, si assiste ad una riduzione significativa dell'ampiezza della AHP.

L'azione di modulazione in senso negativo sull'AHP indotta dal neuropeptide è probabilmente dovuta ad una riduzione dell'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi; infatti, bloccando con apamina la conduttanza  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dipendente (che determina la AHP insieme alla pompa di membrana), l'effetto di PACAP-38 resta invariato.

Questi dati suggeriscono che la riduzione dell'ampiezza della AHP indotta dal PACAP-38 possa produrre, in analogia con quanto osservato in precedenza (Scuri et al., 2007), una maggiore capacità delle cellule T di veicolare lo stimolo tattile producendo una risposta natatoria più repentina osservata a livello comportamentale. Il fatto che l'effetto del neuropeptide sulla AHP si manifesti a 20 min di lavaggio, suggerisce che esso agisca attivando vie intracellulari.

Siamo andati quindi a condurre esperimenti nei quali sono state inibite alcune vie di secondi messaggeri.

L'attività dell'enzima guanilato ciclasa è stata inibita mediante l'applicazione di LY83583 0,1  $\mu\text{M}$ . In presenza di questo inibitore, PACAP-38 continua ad esplicare i suoi effetti sull'ampiezza della AHP.

Al contrario, il neuropeptide non esplica più il suo effetto quando si va a bloccare la via intracellulare mediata da cAMP mediante trattamento con l'inibitore di AC, MDL12330A 1  $\mu\text{M}$ . In questo caso, addirittura, si manifesta un incremento dell'ampiezza della AHP. Questo risultato suggerisce che non solo la via attivata da PACAP-38 nelle cellule T sia quella del cAMP ma che questo messaggero svolga un ruolo modulatorio sull'ampiezza dell'AHP.

Che l'azione di PACAP-38 anche in *H. medicinalis* sia mediata dal cAMP è in linea con molti dati della letteratura.

In *Drosophila*, già negli anni '90, Kandel e Abel (Kandel & Abel, 1995) individuarono nell'attivazione di AC il meccanismo intracellulare che determina l'instaurarsi del condizionamento olfattivo mediato dal peptide PACAP-simile. Recentemente, nello stesso modello sperimentale, è emerso che PACAP-38, legandosi a recettori di tipo I, modula, via AC e PKA, la corrente  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali di tipo L e contemporaneamente va a mobilizzare le riserve di  $\text{Ca}^{2+}$  dal

reticolo endoplasmatico mediante l'attivazione della via PLC-PKC (Bhattacharya et al., 2004).

La cascata intracellulare che coinvolge AC e PKA sembra mediare anche la sopravvivenza delle cellule granulari di cervelletto indotta da PACAP (Allais et al., 2007).

L'enzima AC sicuramente riveste un ruolo chiave nelle cascate intracellulari attivate da PACAP-38 e i dati ottenuti in questo lavoro di tesi sembrano evidenziare un coinvolgimento di AC anche nell'effetto indotto dal neuropeptide sull'ampiezza della AHP dei neuroni T di *Hirudo medicinalis*.

Tuttavia, le azioni mediate dal neuropeptide a livello del sistema nervoso, vedono coinvolti, oltre ad AC, molteplici fattori intracellulari.

Ad esempio, PACAP-38 nel ganglio parasimpatico ciliare supporta la sopravvivenza neuronale via cAMP (AC), PKA e MAPK (Pugh & Margiotta, 2006). Nelle cascate intracellulari attivate da PACAP, spesso sono risultate coinvolte le MAPK: per esempio, il neuropeptide stimola la proliferazione degli astrociti, via cAMP, ERK1/2 (e non PKA e PKC) (Hashimoto et al., 2003); inoltre, PACAP-38 potenzia la corrente  $Ca^{2+}$  dai canali di tipo L nei neuroni del nucleo sovrachiasmatico attivando, via PKC le MAPK (Dziema & Obrietan, 2002).

Allo scopo di meglio delineare la cascata intracellulare attivata da PACAP-38 per esplicitare la sua azione di modulazione dell'ampiezza della AHP nei neuroni T dovranno essere effettuati ulteriori esperimenti.

Nel nostro modello il neuropeptide pare esplicitare il suo effetto via cAMP. cAMP potrebbe indurre una riduzione dell'attività della pompa  $Na^+ / K^+ - ATPasi$  in modo diretto, oppure attivando protein chinasi. Sarà, quindi, interessante chiarire quali fattori intracellulari siano attivati dal mononucleotide ciclico, per determinare l'effetto indotto da PACAP-38.

A tal fine, dovranno essere effettuate registrazioni elettrofisiologiche in presenza di PACAP-38 e di inibitori delle chinasi attivate da cAMP, per indagare un possibile coinvolgimento delle PKA e delle MAPK.

Comprendere i meccanismi d'azione di PACAP-38 nella loro complessità, su un modello riduzionistico come l'invertebrato *H. medicinalis*, verificando la loro

conservazione nella scala filogenetica, può aprire interessanti prospettive future riguardo il possibile impiego terapeutico di questo neuropeptide. Infatti l'utilizzo di PACAP-38 potrebbe portare ad importanti sviluppi nella terapia di patologie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di Alzheimer. A questo proposito la ricerca si sta indirizzando sul possibile impiego terapeutico di neuropeptidi e in particolare proprio di PACAP-38. Ad esempio Koiro e collaboratori (2006) hanno visto, da studi condotti su cellule di neuroblastoma, come PACAP-38 legandosi al suo recettore PAC<sub>1</sub>R sia in grado di aumentare significativamente l'attività dell'enzima  $\alpha$ -secretasi che sappiamo essere l'enzima che processa l'APP (peptide precursore dell'amiloide) impedendo la formazione della  $\beta$ -amiloide responsabile della formazione delle placche senili presenti nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer. In questo lavoro è stato dimostrato che l'attivazione di PAC<sub>1</sub>R porta a sua volta all'attivazione di varie cascate intracellulari connesse le une alle altre e convergenti sulla via delle MAPKs, che esplicano un'azione di stimolazione dell'attività dell'enzima  $\alpha$ -secretasi e non influenzano i livelli di espressione dell'enzima stesso. Questo studio rappresenta, in analogia a quanto da noi osservato, un esempio nel quale l'azione di PACAP-38 si esplica sull'attività di un enzima, anche se i meccanismi molecolari di tale azione non sono ancora chiariti.

## BIBLIOGRAFIA

ACKLIN SE "Electrical properties and anion permeability of doubly rectifying junctions in the leech central nervous system". J. Exp. Biol., 137: 1-11 (1988).

ALLAIS A, BUREL D, ISAAC ER, GRAY SL, BASILLE M, RAVNI A, SHERWOOD NM, VAUDRY H, GONZALEZ BJ "Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide". Eur. J. Neurosci., 25: 2604-18 (2007).

AMBROGI LORENZINI CG, BALDI E, BUCHERELLI C, SACCHETTI B, TASSONI G "Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings". Neurobiol. Learn. Mem., 71: 1-18 (1999).

ARIMURA A, SOMOGYVÁRI-VIGH A, MIYATA A, MIZUNO K, COY DH, KITADA C "Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes". Endocrinol., 129: 2787-9 (1991).

ARIMURA A "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research". Regul. Pept., 37: 287-303 (1992).

ARIMURA A "Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems". Jpn. J. Physiol., 48: 301-31 (1998).

BAGNOLI P, BRUNELLI M, MAGNI F, PELLEGRINO M "The neuron of the fast conducting system in *Hirudo medicinalis*: identification and synaptic connections with primary afferent neurons". Arch. Ital. Biol., 113: 21-43 (1975).

BAYLOR DA, NICHOLLS JG "After-effects of nerve impulses on signalling in the central nervous system of the leech". J. Physiol., 203: 571-89 (1969a).

BAYLOR DA, NICHOLLS JG "Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurones in the central nervous system of the leech". J. Physiol., 203: 591-609 (1969b).

BELARDETTI F, BRUNELLI M, DEMONTIS GC, SONETTI D "Role of serotonin and cAMP on facilitation of the fast conducting system of the leech". Brain Res., 300: 91-102 (1984).

BHATTACHARYA A, LAKHMAN SS, SINGH S "Modulation of L-type calcium channels in *Drosophila* via a pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide (PACAP)-mediated pathway". J. Biol. Chem., 279: 37291-7 (2004).

BOULIS NM, SAHLEY CL "A behavioral analysis of habituation and sensitization of shortening in the semi-intact leech". J. Neurosci., 8: 4621-7 (1988).

BRODFUEHRER PD, FRIESEN WO “Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. I. Output connections of Tr1 and Tr2”. J. Comp. Physiol. [A], 159: 489-502 (1986).

BRODFUEHRER PD, THOROGOOD MS “Identified neurons and leech swimming behaviour”. Prog. Neurobiol., 63: 371-81 (2001).

BRUNELLI M, FRANDI R, MOZZACHIODI R, SCURI R, ZACCARDI ML “May cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  affect non associative learning processes in *H. medicinalis*?” Soc. Neurosci. Abstr., vol 22, part 1:11, 12.6 (1996).

BURRELL BD, SAHLEY CL “Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability”. J. Neurophysiol., 94: 4002-10 (2005).

BURRELL BD, LI Q “Co-induction of long-term potentiation and long-term depression at a central synapse in the leech”. Neurobiol. Learn. Mem. 90: 275–279 (2008).

CACCIATORE TW, ROZENSHTEYN R, KRISTAN WB JR “Kinematics and modeling of leech crawling: evidence for an oscillatory behavior produced by propagating waves of excitation”. J. Neurosci., 20: 1643-55 (2000).

CASTORINA A, TIRALONGO A, GIUNTA S, CARNAZZA ML, RASI G, D'AGATA V “PACAP and VIP prevent apoptosis in schwannoma cells”. Brain Res. 1241: 29-35 (2008).

CATALDO E, BRUNELLI M, BYRNE JH, AV-RON E, CAI Y, BAXTER DA “Computational model of touch sensory cells (T cells) of the leech: role of the afterhyperpolarization (AHP) in activity-dependent conduction failure”. J. Comp. Neurosci., 18: 5-24 (2005).

CATARSI S, BRUNELLI M “Serotonin depresses the after-hyperpolarization through the inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  electrogenic pump in the sensory neurones of the leech”. J. Exp. Biol., 155: 261-73 (1991).

CATARSI S, SCURI R, BRUNELLI M “Cyclic AMP mediates inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  electrogenic pump by serotonin in tactile sensory neurons of the leech”. J. Physiol., 462: 229-42 (1993).

COGGESHALL RE, FAWCETT DW “The fine structure of the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*”. J. Neurophysiol., 27: 229-89 (1964).

- COLOMBAIONI L, BRUNELLI M “Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the central nervous system of *Hirudo medicinalis*”. Exp. Biol., 47: 139-144 (1988).
- DAVIS RL “Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants”. Physiol. Rev., 76: 299-317 (1996).
- DEBSKI EA, FRIESEN WO “Habituation of swimming activity in the medicinal leech”. J. Exp. Biol., 116: 169-88 (1985).
- DECHANT G, NEUMANN H “Neurotrophins”. Adv. Exp. Med. Biol., 513: 303-34 (2002).
- DEJDA A, SOKOŁOWSKA P, NOWAK JZ “Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI”. Pharmacol. Rep., 57: 307-20 (2005).
- DI MAURO M, CAVALLARO S, CIRANNA L “Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modifies the electrical activity of CA1 hippocampal neurons in the rat”. Neurosci. Lett., 337: 97-100 (2003).
- DZIEMA H, OBRIETAN K “PACAP potentiates L-type calcium channel conductance in suprachiasmatic nucleus neurons by activating the MAPK pathway”. J. Neurophysiol., 88: 1374-86 (2002).
- ECKERT R “Electrical interaction of paired ganglion cells in the leech”. J. Gen. Physiol., 46: 573-87 (1963).
- FEANY MB, QUINN WG “A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant amnesiac”. Science, 268: 869-73 (1995).
- FRIESEN WO, CANG J “Sensory and central mechanisms control intersegmental coordination”. Curr. Opin. Neurobiol., 11: 678-83 (2001).
- GUSTAFSSON B “Afterhyperpolarization and the control of repetitive firing in spinal neurones of the cat” Acta Physiol. Scand. Suppl., 416: 1-47 (1974).
- HAGIWARA S, MORITA H “Electrotonic transmission between two nerve cells in the leech ganglion”. J. Neurophysiol., 25: 721-31 (1962).
- HASHIMOTO H, SHINTANI N, BABA A “Higher brain functions of pacap and a homologous *drosophila* memory gene amnesiac: insights from knockouts and mutants”. Biochem. Biophys. Res. Commun., 297: 427-31 (2002).
- HASHIMOTO H, KUNUGI A, ARAKAWA N, SHINTANI N, FUJITA T, KASAI A, KAWAGUCHI C, MORITA Y, HIROSE M, SAKAI Y, BABA A “Possible involvement of a cyclic amp-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes”. Biochem. Biophys. Res. Commun., 311: 337-43 (2003).

HERNÁDI L, PIRGER Z, KISS T, NÉMETH J, MARK L, KISS P, TAMAS A, LUBICS A, TOTH G, SHIODA S, REGLÓDI D “The presence and distribution of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide and its receptor in the snail *Helix pomatia*”. Neurosci., 155: 387-402(2008).

HILL RH, ARHEM P, GRILLNER S “Ionic mechanisms of 3 types of functionally different neurons in the lamprey spinal cord”. Brain Res., 358: 40-52 (1985).

HUANG Q, LÉGRÁDI G, ARIMURA A “Perfusion of the paraventricular nucleus with pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide stimulates local release of norepinephrine and its metabolite: microdialysis study in freely moving rats”. Ann. N. Y. Acad. Sci., 805: 737-42 (1996).

JANSEN JKS, NICHOLLS JG “Conductance changes, an electrogenic pump and the hyperpolarization of leech neurons following impulses”. J. Physiol., 229: 635-55 (1973).

KANDEL E, ABEL T “Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage”. Science, 268: 825-6 (1995).

KERKUT GA THOMAS RC “An electrogenic sodium pump in snail nerve cells”. Comp. Biochem. Physiol., 14: 167-83 (1965).

KOJRO E, POSTINA R, BURO C, MEIRINGER C, GEHRIG-BURGER K, FAHRENHOLZ F “The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein”. FASEB J., 20: 512-4 (2006).

KRISTAN WB Jr “The neurobiology of swimming in the leech”. T.I.N.S., 6: 84-8 (1983).

KRISTAN WB JR, EISENHART FJ, JOHNSON LA, FRENCH KA “development of neuronal circuits and behaviors in the medicinal leech”. Brain Res. Bull., 53: 561-70 (2000).

KRISTAN WB JR, CALABRESE RL, FRIESEN WO “Neuronal control of leech behaviour”. Prog. Neurobiol., 76: 279-327 (2005).

KUFFLER SW, NICHOLLS JG “From neuron to brain”. Sinauer Ass. Inc. Publisher, USA, (1976).

LEE M, LELIEVRE V, ZHAO P, TORRES M, RODRIGUEZ W, BYUN JY, DOSHI S, IOFFE Y, GUPTA G, DE LOS MONTEROS AE, DE VELLIS J, WASCHEK J “Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors”. J. Neurosci., 21:3849-59 (2001).



LENT CM "Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech". Science, 179: 693-96 (1973).

LINDVALL O, KOKAIA Z, BENGZON J, ELMÉR E, KOKAIA M "Neurotrophins and brain insults". Trends Neurosci., 17: 490-6 (1994).

LIU GJ, MADSEN BW "PACAP38 modulates activity of NMDA receptors in cultured chick cortical neurons". J. Neurophysiol., 78: 2231-4 (1997).

LOCKERY SR, KRISTAN WB JR "Distributed processing of sensory information in the leech. I. Input-output relations of the local bending reflex". J. Neurosci., 10: 1811-5 (1990a).

LOCKERY SR, KRISTAN WB JR "Distributed processing of sensory information in the leech. II. Identification of interneurons contributing to the local bending reflex". J. Neurosci., 10: 1816-29 (1990b).

LOCKERY SR, KRISTAN WB JR "Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech". J. Comp. Physiol. [A], 168: 165-77 (1991).

LOMBARDO P, SCURI R, CATALDO E, CALVANI M, NICOLAI R, MOSCONI L, BRUNELLI M "Acetyl-L-carnitine induces a sustained potentiation of the afterhyperpolarization". Neurosci., 128: 293-303 (2004).

MACAGNO ER "Number and distribution of neurons in the leech segmental ganglion". J. Comp. Neurol., 190: 283-302 (1980).

MACDONALD DS, WEERAPURA M, BEAZELY MA, MARTIN L, CZERWINSKI W, RODER JC, ORSER BA, MACDONALD JF "Modulation of NMDA receptors by pituitary adenylate cyclase activating peptide in CA1 neurons requires G alpha q, protein kinase C, and activation of Src". J. Neurosci., 25: 11374-84 (2005).

MACDONALD JF, JACKSON MF, BEAZELY MA "G protein-coupled receptors control NMDARs and metaplasticity in the hippocampus". Biochim. Biophys. Acta, 1768: 941-51 (2007).

MARTIN JL, GASSER D, MAGISTRETTI PJ "Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide potentiate *c-fos* expression induced by glutamate in cultured cortical neurons". J. Neurochem., 65: 1-9 (1995).

MASON A, SUNDERLAND AJ LEAKE JD "Effects of the leech Rz cells on body wall muscles". Comp. Biochem. Physiol., 63: 359-61 (1979).

MASUO Y, MATSUMOTO Y, TOKITO F, TSUDA M, FUJINO M "Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating

polypeptide (PACAP) on the spontaneous release of acetylcholine from the rat hippocampus by brain microdialysis”. Brain. Res., 611: 207-15 (1993).

MCRORY J, SHERWOOD NM “Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members”. Endocrinol., 138: 2380-90 (1997).

MEI YA, VAUDRY D, BASILLE M, CASTEL H, FOURNIER A, VAUDRY H, GONZALEZ BJ “PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I<sub>k</sub> in the anti-apoptotic action of PACAP”. Eur. J. Neurosci., 19: 1446-58 (2004).

MEYER DK “The effects of PACAP on neural cell proliferation”. Regul. Pept., 137: 50-7 (2006).

MICHEL S, ITRI J, HAN JH, GNIOTCZYNSKI K, COLWELL CS “Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus”. BMC Neurosci., 7: 15 (2006).

MIYATA A, ARIMURA A, DAHL RR, MINAMINO N, UEHARA A, JIANG L, CULLER MD, COY DH “Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells”. Biochem. Biophys. Res. Commun., 164: 567-74 (1989).

MOLNÁR L, POLLÁK E, BOROS A, REGLÖDI D, TAMÁS A, LENGVARI I, ARIMURA A, LUBICS A “Comparative anatomy of PACAP-immunoreactive structures in the ventral nerve cord ganglia of lumbricid oligochaetes”. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1070: 427-30 (2006).

MOLNÁR L, POLLÁK E, BOROS A, SHIODA S, NAKAJO S, TAMÁS A, LENGVÁRI I, REGLÖDI D, LUBICS A “PAC1 receptor localization in a model nervous system: light and electron microscopic immunocytochemistry on the earthworm ventral nerve cord ganglia”. Regul. Pept., 145: 96-104 (2008).

MOZZACHIODI R, SCURI R, ROBERTO M, BRUNELLI M “Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses after hyperpolarization in Invertebrate neurons”. Neurosci., 107: 519-25 (2001).

MULLER KJ, Mc MAHAN VJ “The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase”. Proc. Roy. Soc. B., 194: 481-99 (1976).

MULLER KJ, NICHOLLS JG, STENT GS “Neurobiology of the leech”, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory (1981).

NAKAJIMA S, TAKAHASHI K “Post-tetanic hyperpolarization and electrogenic Na<sup>+</sup>-pump in stretch receptor neurone of crayfish”. J. Physiol., 187: 105-27 (1966).

NICHOLLS JG, PURVES D “Monosynaptic chemical and electrical connexions between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech”. J. Physiol., 209: 647-67 (1970).

PINEDA JC, GALLARAGA E, BARGAS J, CRISTANCHO M, ACEVES J “Charybdotoxin and apamine sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons”. J. Neurophysiol., 68: 287-94 (1992).

PIRGER Z, NEMETH J, HIRIPI L, TOTH G, KISS P, LUBICS A, TAMAS A, HERNADI L, KISS T, REGLODI D “PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia*”. J. Mol. Neurosci., 36: 105-14 (2008).

PRZYWARA DA, GUO X, ANGELILLI ML, WAKADE TD, WAKADE AR “A non-cholinergic transmitter, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, utilizes a novel mechanism to evoke catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells”. J. Biol. Chem., 271: 10545-50 (1996).

PUGH PC, MARGIOTTA JF “PACAP support of neuronal survival requires MAPK- and activity-generated signals”. Mol. Cell. Neurosci., 31: 586-95 (2006).

ROBERTO M, BRUNELLI M “PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region”. Learn. Mem., 7: 303-11 (2000).

ROBERTO M, SCURI R, BRUNELLI M “Differential effects of PACAP-38 on synaptic responses in rat hippocampal CA1 region”. Learn. Mem., 8: 265-71 (2001).

SACCHETTI B, LORENZINI CA, BALDI E, BUCHERELLI C, ROBERTO M, TASSONI G, BRUNELLI M “Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide hormone (PACAP) at very low dosages improves memory in the rat”. Neurobiol. Learn. Mem., 76: 1-6 (2001).

SAH P “Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation”. T.I.N.S., 19: 150-4 (1996).

SAH P, McLACHAN EM “Potassium current contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons”. J. Neurophysiol., 68: 1834-41 (1992).

SCURI R, MOZZACHIODI R, BRUNELLI M “Activity-dependent increase of the AHP amplitude in T sensory neurons of the leech”. J. Neurophysiol., 88: 2490-2500 (2002).

SCURI R, MOZZACHIODI R, BRUNELLI M “Role for calcium signaling and arachidonic acid metabolites in the activity-dependent increase of AHP amplitude in leech T sensory neurons”. J. Neurophysiol., 94: 1066-73 (2005).

SCURI R, LOMBARDO P, CATALDO E, RISTORI C, BRUNELLI M “Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech”. Eur. J. Neurosci., 25: 159-67 (2007).

SHAW BK, KRISTAN WB JR “Relative roles of the S cell network and parallel interneuronal pathways in the whole-body shortening reflex of the medicinal leech”. J. Neurophysiol., 82: 1114-23 (1999).

SHERWOOD NM, KRUECKL SL, MCRORY JE “The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily”. Endocr. Rev., 21: 619-70 (2000).

SHIODA S, OHTAKI H, NAKAMACHI T, DOHI K, WATANABE J, NAKAJO S, ARATA S, KITAMURA S, OKUDA H, TAKENOYA F, KITAMURA Y “Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment”. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1070: 550-60 (2006).

SOMOGYVÁRI-VIGH A, REGLÖDI D, LI M, LENGVÁRI I, VIGH S, ARIMURA A “Tissue distribution of PACAP27 and -38 in oligochaeta: PACAP27 is the predominant form in the nervous system of *Lumbricus polyphemus*”. Peptides, 21: 1185-91 (2000).

STELLA N, MAGISTRETTI PJ “Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potentiate the glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse cortical neurons. Evidence for a cAMP-independent mechanism”. J. Biol. Chem., 271: 23705-10 (1996).

STORM JF “Action potential repolarization and a fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells”. J. Physiol., 385: 733-59 (1987).

STORM JF “An afterhyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells”. J. Physiol., 409: 171-90 (1989).

VAN ESSEN DC “The contribution of membrane hyperpolarization to adaptation and conduction block in sensory neurones of the leech”. J. Physiol., 230: 509-34 (1973).

VARHALMI E, SOMOGYI I, KISZLER G, NEMETH J, REGLÖDI D, LUBICS A, KISS P, TAMAS A, POLLÁK E, MOLNÁR L “Expression of PACAP-like compounds during the caudal regeneration of the earthworm *Eisenia fetida*”. J. Mol. Neurosci., 36: 166-74 (2008).

VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, FOURNIER A, VAUDRY H “Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 9415-20 (1999).

VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, YON L, FOURNIER A, VAUDRY H “Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions”. Pharmacol. Rev., 52: 269-324 (2000).

VILLALBA M, BOCKAERT J, JOURNOT L “Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway”. J. Neurosci., 17: 83-90 (1997).

WATANABE J, NAKAMACHI T, MATSUNO R, HAYASHI D, NAKAMURA M, KIKUYAMA S, NAKAJO S, SHIODA S “Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development”. Peptides, 28: 1713-9 (2007).

WILLIAMSON A, ALGER BE “Characterization of an early afterhyperpolarization after a brief train of action potentials in rat hippocampal neurons in vitro”. J. Neurophysiol., 63: 72-81 (1990).

YAU KW “Receptive fields, and conduction block of sensory neurons in the central nervous system of the leech”. J. Physiol., 263: 513-38 (1976).

ZACCARDI ML, TRAINA G, CATALDO E, BRUNELLI M “Nonassociative learning in the leech *Hirudo medicinalis*”. Behav. Brain. Res., 126: 81-92 (2001).

ZACCARDI ML, TRAINA G, CATALDO E, BRUNELLI M “Sensitization and dishabituation of swim induction in the leech *Hirudo medicinalis*: role of serotonin and cyclic AMP”. Behav. Brain. Res., 153: 317-26 (2004).